

Université de Montréal

Effet de l'atorvastatine sur la dysfonction endothéliale des artères coronaires
épicardiques associée à l'hypertrophie ventriculaire gauche dans un modèle
porcin

Par

Jessica Forcillo

Programme de Sciences Biomédicales

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en Sciences Biomédicales

Août 2008

©, Jessica Forcillo, 2008

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :
Effet de l'atorvastatine sur la dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques
associée à l'hypertrophie ventriculaire gauche dans un modèle porcin

Présenté par
Jessica Forcillo

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

président-rapporteur :
Dr Philippe Demers

directeur de recherche :
Dr Louis P. Perrault

membre du jury :
Dr Michel Jarry

Effet de l'atorvastatine sur la dysfonction endothéliale des artères coronaires épigardiques associée à l'hypertrophie ventriculaire gauche dans un modèle porcin

Forcillo J, Aubin MC, Horn A, Shi YF, Carrier M, Tardif JC, Perrault LP

Introduction: L'atorvastatine par ses effets pléiotropiques pourrait limiter la dysfonction endothéliale associée au développement de l'HVG.

Méthodologie : Un cerclage de l'aorte ascendante pendant 2 mois entraîne le développement d'HVG et les groupes ont été traités avec atorvastatine 40 ou 80 mg de 60 à 90 jours. L'HVG est confirmée par échographie. La réactivité vasculaire est évaluée en chambres d'organe, la fonction endothéliale par la quantification de la GMPc et des nitrites/nitrates plasmatiques. Le stress oxydant est mesuré par les niveaux d'ANG II et de la carbonylation des protéines.

Résultats : Après 60 et 90 j de cerclage, l'HVG est observée chez tous ces groupes. Les courbes concentrations-réponse des anneaux des artères coronaires épigardiques des groupes traités avec l'atorvastatine 40 et 80 mg pour 30 et 60 jours n'ont démontré aucune amélioration des relaxations dépendantes de l'endothélium. Une exacerbation significative de la dysfonction endothéliale a été observée. Les niveaux vasculaires de GMPc sont significativement diminués dans le groupe sans cerclage traité 60 d et ceux d'ANG II sont fortement augmentés chez ce dernier groupe ainsi que le groupe traité avec 80 mg pour 30 jours par rapport aux contrôles. L'expression de la carbonylation des protéines est augmentée dans le groupe témoin traité avec atorvastatine 80 mg, reflétant une augmentation du stress oxydant.

Conclusion : L'administration d'atorvastatine ne prévient pas le développement de l'HVG ni la dysfonction endothéliale dans notre modèle. Au contraire l'atorvastatine à haute dose a un effet toxique sur les artères coronaires épigardiques en augmentant la dysfonction endothéliale.

Hypertrophie ventriculaire gauche — Artères coronaires — Dysfonction endothéliale — Stress oxydant — Statine

Effect of atorvastatin on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy in a porcine model.

Forcillo J, Aubin MC, Horn A, Shi YF, Carrier M, Tardif JC, Perrault LP

Background: Atorvastatin, through pleiotropic effects, may prevent or reverse the endothelial dysfunction associated with LVH. **Methods:** After performing a banding of the ascending aorta for 2 months leading to the development of LVH, groups have been treated with atorvastatin 40 or 80 mg for 60 and 90 day periods. LVH was evaluated by echocardiographic studies. Vascular reactivity studies were performed in organ chambers. In vitro endothelial function was evaluated by plasmatic nitrites/nitrates, the degradations products of nitric oxide, and cGMP quantification. To quantify and qualify oxidative stress, protein carbonyl and angiotensin II levels were assessed.

Results: Following 60 and 90 days of aortic banding, the development of LVH was observed in these groups. Concentration-response curves from rings of epicardial coronary arteries of groups treated with atorvastatin 40 and 80 mg for 30 and 60 days showed a significant decrease of endothelium-dependent relaxations with worsening of the endothelial dysfunction. Levels of cGMP were significantly decreased in the 60 days treated sham group and levels of ANG II were increased in the latter and also in the 90 days banded groups treated with 80 mg for 30 days compared to controls. The expression of protein carbonyl increased in the sham group treated with atorvastatin 80 mg compatible with an increase in oxidative stress.

Conclusion: The administration of atorvastatin does not limit the development of LVH nor the endothelial dysfunction in our model. On the opposite, atorvastatin at a high dose has a toxic effect on epicardial coronary arteries by exacerbating the endothelial dysfunction.

Left ventricular hypertrophy — Coronary arteries — Endothelial dysfunction —
Oxidative stress — Statin

TABLE DES MATIÈRES

<i>IDENTIFICATION DES MEMBRES DU JURY</i>	ii
<i>RÉSUMÉ</i>	iii
<i>SUMMARY</i>	iv
<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	v-viii
<i>LISTE DES FIGURES</i>	viii-x
<i>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</i>	xi-xv
<i>DÉDICACE</i>	xvii
<i>REMERCIEMENTS</i>	xvii
<i>L'AVANT-PROPOS</i>	xviii
CHAPITRE PREMIER : Introduction	1
CHAPITRE DEUXIÈME : L'endothélium vasculaire	4
Anatomie des cellules endothéliales.....	5
Endothélium sain; fonctions.....	5
Contrôle du tonus vasculaire.....	7
Contrôle de la croissance des cellules vasculaires musculaires lisses.....	9
<i>Facteurs vasorelaxants (EDRFs)</i>	10
Le monoxyde d'azote (NO).....	10
- Biosynthèse du NO.....	10
- Régulation des espèces du monoxyde d'azote (NOS).....	11
La prostacycline (PGI ₂).....	14
Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF).....	15
L'adénosine.....	16
La bradykinine.....	16
L'histamine.....	17
<i>Facteurs vasocontractants (EDCFs)</i>	17
Les prostaglandines/thromboxanes.....	18
L'endothéline.....	18
L'angiotensine II.....	20
L'endothélium et le système rénine-angiotensine (SRA).....	21
<i>Contrôle humoral de la circulation</i>	22
La norépinéphrine (NE) et l'épinéphrine (E).....	22
La vasopressine (ADH).....	23
Stress oxydant et radicaux libres.....	23
La xanthine oxydase (XO).....	25
Le peroxy-nitrite (ONOO ⁻).....	25
L'anion superoxyde.....	26
La glutathion peroxydase.....	27
Les produits oxydants et l'athérosclérose.....	27
Les espèces oxygénées activées (EOA) et l'hypertrophie cardiaque.....	28

CHAPITRE TROISIÈME : LE PROCESSUS DE FORMATION LIPIDIQUE.....29

Les apolipoprotéines.....	30
La répartition des apolipoprotéines dans les lipoprotéines.....	30
Le cholestérol.....	31
Les triglycérides.....	31
L'hyperlipidémie.....	32
L'hyperhomocystéinémie.....	32
<i>Le système immunologique et l'athérogenèse (ASO).....</i>	<i>33</i>
- Étiologie de l'ASO.....	33
- La plaque d'athérome.....	34
- Stress oxydant et l'ASO.....	34
- Inflammation et l'ASO.....	36
- Facteurs hémodynamiques et l'ASO.....	36
- Dysfonction endothéliale et l'ASO.....	37

CHAPITRE QUATRIÈME : LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE.....39

Pathogenèse de la dysfonction endothéliale.....	40
La régénération de l'endothélium et la sénescence.....	43

CHAPITRE CINQUIÈME : HYPERTROPHIE VENTRICULAIRE GAUCHE ET DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE.....44

Prévalence.....	45
La physiopathologie de l'hypertrophie ventriculaire.....	45
Trois mécanismes impliqués dans la genèse d'un gradient de pression dynamique.....	46
<i>Les causes de l'hypertrophie.....</i>	<i>48</i>
- Composante myocardique.....	48
- Composante vasculaire.....	49
- Composante neurale.....	49
Hypertrophie cardiaque et apoptose.....	49
Sténose aortique.....	49
Stratégies thérapeutiques pour améliorer la dysfonction endothéliale et l'hypertrophie ventriculaire gauche.....	50
Agents bénéfiques dans le traitement de la dysfonction endothéliale et de l'hypertrophie ventriculaire gauche.....	51
- Les régulateurs de la libération de NO.....	51
- Les inhibiteurs de la iNOS.....	51
- Le tétrahydrobioptérine (BH ₄).....	51
- La combinaison de l'hydralazine nitrate	51
- Les salicylates donneurs de NO : NCX-4016.....	52
- La thérapie génique	52
- Les inhibiteurs du stress oxydant.....	52
- Les inhibiteurs de la xanthine oxydase (XO).....	52
- Traitement aux folates.....	53
- Les antioxydants.....	53
- Le probucol.....	53
- La vitamine E et la vitamine C.....	54
- Les hypolipidémiants.....	55
- Acyl-CoA : cholestérol acyltransférase.....	55

CHAPITRE SIXIÈME : LES STATINES ET LEURS EFFETS PLÉIOTROPIQUES; EFFETS SUR LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE.....56

Les effets des statines.....	57
Mécanismes d'action des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase.....	58
L'atorvastatine.....	59
Effet hypolipidémiant des statines.....	60
<i>Effet des statines sur la dysfonction endothéliale.....</i>	<i>62</i>
- Effet des statines sur la libération du NO.....	62
- Effet des statines sur l'endothéline.....	65
- Effet antioxydant des statines.....	65
- Effet antioxydant des statines et répercussion sur l'hypertrophie ventriculaire gauche.....	66
- Effet anti-inflammatoire des statines.....	68
- Effet antithrombotique des statines.....	69
- Effet des statines sur l'angiogenèse.....	69
- Effet de la eNOS sur la densité des capillaires myocardiques en présence d'atorvastatine.....	70

CHAPITRE SEPTIÈME : APPLICATIONS CLINIQUES DES STATINES72

L'athérosclérose (ASO).....	73
L'insuffisance cardiaque (IC).....	73
L'hypertension artérielle (HTA).....	75
La fibrillation auriculaire (FA).....	76
Le diabète	76
Les propriétés gastroprotectives des statines	78
Les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) et le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (SDRA).....	78
Les maladies neurodégénératives.....	78
Les événements cérébrovasculaires et la revascularisation.....	78
Le cancer.....	79
La chirurgie cardiaque.....	79
<i>HYPOTHÈSES ET BUTS.....</i>	<i>81</i>
<i>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</i>	<i>82</i>
<i>RÉSULTATS.....</i>	<i>91</i>
<i>DISCUSSION.....</i>	<i>107</i>
<i>CONCLUSION.....</i>	<i>121</i>
<i>SOURCES DOCUMENTAIRES.....</i>	<i>125</i>

FIGURES

Chapitre deuxième :

Figure 1 : *Schéma résumant la relâche des facteurs de relaxation des cellules endothéliales et leurs effets sur les cellules musculaires lisses*

ACh : acétylcholine ; A23187 : calcium ionophore A23187 ; BK : bradykinine ; B₂ : récepteur de bradykinine B₂ ; cAMP adénosine monophosphate cyclique ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ; EET : acide époxyéicosatriénoïque ; K⁺ : canaux potassiques ; M₁, M₃ : sous-types de récepteurs muscariniques M₁ et M₃ ; NOS : monoxyde d'azote synthase ; PGI₂ : prostacycline ; P450 : cytochrome P-450 monooxygénase ; TBA : tétrabutylammonium ; TEA : tétraéthylammonium. La ligne pointillée indique l'action d'un inhibiteur ou d'un antagoniste (Vanhoutte, 2004)
.....p.7

Figure 2 : *Multiplicité des facteurs relaxants et contractants dérivés de l'endothélium.*

AA= acide arachidonique; ACh=acétylcholine; AT II= angiotensine II; BK= bradykinine; COX= cyclooxygénase; ECE= enzyme de conversion de l'endothéline; EDHF= facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium; ET= endothéline-1; O₂⁻= anions superoxyde; P= purines; PGI₂= prostacycline; NO= monoxyde d'azote; NOS= monoxyde d'azote synthase; T= thrombine; TA₂/ Endo= récepteur TP; VP= vasopressine; TXA₂= thromboxane A₂; 5-HT= 5 hydroxytryptamine (sérotonine); α= alpha adrénergique . (Vanhoutte, 2000).....p.9

Figure 3 : Modulation de la production d'endothéline 1 (ET-1) dans les cellules endothéliales. + = stimulation; - = inhibition. Abréviations : ANF, facteur natriurétique auriculaire ; AT II= angiotensine II; IL-1= interleukine 1; LDL= lipoprotéine de basse densité; PF= prostaglandines; TGF-β= facteur de croissance tumorale (Vanhoutte, 2000).....p.20

Figure 4 : Voies biochimiques impliquées dans la production et le métabolisme de radicaux libres de l'oxygène (RLO) : ONOO^- : peroxynitrite; O_2^- = anion superoxyde; OH^\bullet = radical hydroxyl; H_2O_2 : hydrogène peroxyde (Polla, 1999).....p.27

Chapitre troisième

Figure 5 : Cascade de synthèse du cholestérol avec des produits sans groupement stérol, FPP et GGPP, et sites d'action des statines. Les statines modulent l'activation de la eNOS directement par la voie PI3K/Akt et indirectement par l'inhibition de l'activation de Rho. L'activation relative de Ras et de Rho est induite par l'inhibition de la demi-vie des stérols par une faible dose de statines, et cette inactivation est induite par l'inhibition de la voie entière de mévalonate par une forte dose de statines (Masaaki, 2007).....p.31

Chapitre quatrième

Figure 6 : La dysfonction endothéliale et ses facteurs de risque. L'endothélium représente une barrière mécanique et biologique entre la paroi vasculaire et le sang. Les facteurs de risque, les facteurs locaux, les facteurs génétiques et des facteurs inconnus traditionnels et non traditionnels déterminent le statut de la fonction endothéliale, qui peut être déterminé comme un index intégré du risque total cardiovasculaire et des facteurs cardioprotecteurs de chaque individu. La présence de dysfonction endothéliale reflète un milieu vasculaire athérogénique qui est associé à des événements cardiovasculaires. (Bonetti, 2003).....p.40

Chapitre sixième

Figure 7 : Cellules endothéliales activées par des LDL oxydées et par une variété de cytokines inflammatoires et les sites d'action des statines. Les statines inhibent directement ou indirectement les activités de l'endothélium par une réduction des niveaux de LDL plasmatique, menant ainsi à une vasoconstriction ou à une prolifération des cellules musculaires lisses (Masaaki, 2007).....p.59

Figure 8 : Schéma de la voie du mévalonate et effet des statines sur l'expression de la eNOS et sur l'inhibition du NADPH oxydase. Les statines (les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase) inhibent la conversion des isoprénoides et du cholestérol. Via l'inhibition de la géranyl-géranylation, les statines inactivent les petites protéines G Rho et Rac. Rho mène à l'augmentation de la biodisponibilité du NO et Rac inhibe l'activité du NADPH oxydase et la production de superoxyde CoA, coenzyme A; PP-pyrophosphate (Endres, 2004).....p.65

Figure 9 : Mobilisation des cellules endothéliales progénitrices de la moelle et contribution à l'angiogenèse et à la réendothélialisation. eNOS, VEGF, et les molécules d'adhésion contrôlent le recrutement et l'activation des cellules endothéliales progénitrices induits par les statines dans la réendothélialisation de la paroi vasculaire ou dans des foci ischémiques où l'angiogenèse/vasculogenèse est fréquemment observé (Masaaki, 2007).....p.70

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

5-HT:	Sérotonine
5-MTHF:	5-méthyl-tétrahydrofolate
8-OHDG:	8-hydroxy-2-déoxyguanosine
A23187:	Calcium ionophore A23187
AA:	Acide arachidonique
AB:	Aortic banding- Cerclage aortique
AC:	Adénylate cyclase
ACAT:	Cholestérol acétyltransférase
ACE:	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACEI:	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
ACh:	Acétylcholine
ACV:	Accidents cérébraux vasculaires
ADH:	Hormone antidiurétique, vasopressine
ADMA:	Diméthylarginine asymétrique
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADP:	Adénosine diphosphate
Akt:	Protéine kinase α -sérine/thréonine
AMPC:	Adénosine monophosphate cyclique
ANG:	Angiotensine
ANP:	Peptide natriurétique auriculaire
Apo:	Apolipoprotéine
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
AAS:	Acide acétylsalicylique
ASO:	Athérosclérose
AT ₁ /AT ₂ :	Récepteur de types 1 et 2 de l'angiotensine II
AT III:	Antithrombine III
ATP:	Adénosine triphosphate
B ₂ :	Récepteur de bradykinine B ₂
BH ₄ :	Tétrahydrobioptérine

BK: Bradykinine
 BNF: Facteur natriurétique sanguin
 BNP: Peptide natriurétique de type-B
 Ca^{++} : Calcium
 CA: Cerclage aortique
 CAD: Coronary heart disease- Maladie coronarienne
 CaM: Calmoduline
 CAT: Catalase
 CaV-1: Cavéoline-1
 CE: Cellules endothéliales
 CH: Cholestérol
 cNOS: monoxyde d'azote synthase constitutif
 CNP: Peptide natriurétique de type C
 CML: Cellules musculaires lisses
 COX: Cyclooxygénase
 DAF: Facteur accélérateur de dissociation
 DAG: Diacylglycérol
 Db: Diabète
 ECA: Enzyme de conversion de l'angiotensine
 ECE: Enzyme de conversion de l'endothéline
 EDCFs: Facteurs contractants dépendants de l'endothélium
 EDHF: Facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium/hyperpolarisation
 dépendante de l'endothélium
 EDRFs: Facteurs relaxants dépendants de l'endothélium
 EET: Acide époxyécosatriénoïque
 EGF: Facteur de croissance épidermique
 eNOS: Monoxyde d'azote synthétase endothéliale
 EOA: Espèces oxygénées activées
 ET-1: Endothéline-1
 ET_A: Récepteur de type A de l'endothéline
 ET_B: Récepteur de type B de l'endothéline

FAD: Flavine adénine dinucléotide
FMD: Dilatation secondaire au flot sanguin
FMN: Flavine mononucléotide
FPP: Farnésyl-PP
GCs: Guanylate cyclase soluble
GGPP: Géranyl-géranyl-PP
GMPc: Guanosine monophosphate cyclique
GP: Glycoprotéine
GPx: Glutathion peroxydase
GR: Glutathion réductase
GSH: Glutathion réduit
GSSG: Glutathion oxydé
GTP: Guanosine triphosphate
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
tHcy: Homocystéine thiolactone
HDL: Lipoprotéine de haute densité
HMG-CoA: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
HO: Holmium
HTA: Hypertension artérielle
HTP: Hypertension pulmonaire
HVG: Hypertrophie ventriculaire gauche
HOCl: Acide hypochlorique
IC: Insuffisance cardiaque
ICAM: Molécule d'adhésion intercellulaire
IDL: Lipoprotéine de densité intermédiaire
IFN: Interféron
IL: Interleukine
IM: Infarctus du myocarde
iNOS: Monoxyde d'azote synthétase inductible
IP: Récepteur de la prostacycline
I/R: Ischémie/ reperfusion

K_{ca}: Canal potassique sensible au calcium
L-arg: L-arginine
LDL: Lipoprotéine de faible densité
L-NMMA: Inhibiteur du monoxyde d'azote synthase
LOX: Récepteur de LDR oxydé par une « lectine-like »
LPS: Lipopolysaccharides
LVH: Left ventricular hypertrophy- Hypertrophie ventriculaire gauche
LXR: Récepteurs X du foie
M₁, M₃: Récepteur muscarinique 1 et 3
MC: maladie cardiovasculaire
MCP-1: Protéine chimioattractante monocyttaire de type 1
MMP: Métalloprotéinase matricielle
MPOC: Maladie pulmonaire obstructive chronique
NAC: N-acétylcystéine
NAD: Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NEP: Endopeptidase neutre
nNOS: Monoxyde d'azote synthétase neuronale
NO₂Tyr: Nitrotyrosine
NOHA: N-hydroxyarginine
NOS: Monoxyde d'azote synthétase
NO: Monoxyde d'azote
O₂⁻: Anion superoxyde
OH[•]: Radical hydroxyl
ONOO⁻: Peroxynitrite
ONOOH: Acide peroxynitrique
PAI: Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PDGF: Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGH₂: Prostaglandine H₂

PGI₂: Prostacycline

PIN: Protéine inhibitrice de la NOS-1

PKC: Protéine kinase C

PP: Pyrophosphate

PPAR: Récepteurs activés par la prolifération des peroxysomes

ROR: Récepteur nucléaire orphelin

SHR: Rat spontanément hypertendu

SOD: Superoxyde dismutase

SRA: Système rénine-angiotensine

TA: Tension artérielle

TF: Facteur tissulaire

TFPI: Inhibiteur plasmatique du facteur tissulaire

TGF- β : Facteur de croissance tissulaire bêta

TNF- α : Facteur de nécrose tissulaire alpha

tPAI: Facteur anti-fibrinolytique

TSP-1: Thrombospondine-1

TXA₂: Thromboxane A₂

UTP: Protéine Uridylyltransférase

VCAM-1: Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire

VEGF: Facteur de croissance vasculaire endothélial

VLDL: Lipoprotéine de très basse densité

XDH: Xanthine déshydrogénase

XO: Xanthine oxydase

XOR: Xanthine oxydoréductase

"Un homme n'est pas malheureux parce qu'il a de l'ambition, mais parce qu'il en est dévoré."

Montesquieu.

Je dédie ce mémoire à ma grand-mère Thérèse Babin qui a été une des personnes les plus présente dans ma vie, qui m'a fait grandir, m'a aimé et m'a aidé à toujours vouloir me surpasser dans tous les aspects de ma vie en ne cessant jamais de croire en moi.

Remerciements

Ce projet a été pour moi un gros défi et une belle réalisation en même temps. Ces deux dernières années ont été le fruit d'efforts acharnés afin que je puisse accomplir mes deux programmes universitaires, MD-MSc. Je n'aurais certainement pas fait aussi bien sans l'appui de personnes chères à mes côtés.

Je remercie mes parents qui ont toujours été là pour m'encourager. Ils ont toujours cru en moi et m'ont supporté dans tous mes projets. Je remercie également mon frère qui me supportait lui aussi et m'encourageait à poursuivre mes buts.

Un merci tout particulier à Marie-Claude Aubin qui m'a appris beaucoup concernant les techniques et les méthodes utilisées en recherche fondamentale.

Merci à Marie-Pierre Mathieu, à Émilie Reny-Nolin, Alexandra Horn et à Stéphanie Blanchet qui ont contribué grandement à la réalisation de ce projet.

Finalement, un merci tout à fait spécial à mon directeur de recherche, le Docteur Louis P. Perrault. Merci de m'avoir donné la chance de travailler dans votre laboratoire. Merci pour les conseils judicieux que vous m'avez donné tant dans la recherche que pour ma profession future. Vous êtes un exemple pour moi et vous m'encouragez à atteindre mes objectifs et à réaliser mes aspirations les plus chères.

L'avant propos

La raison qui m'a poussé à choisir ce laboratoire fut mon intérêt marqué pour les sciences cardiovasculaires. Le modèle d'hypertrophie ventriculaire gauche développé chez les porcs par un cerclage aortique de deux mois a été bien démontré dans le laboratoire du Dr Perrault dont l'intérêt majeur est la dysfonction endothéliale des artères coronaires épiscopiques.

Des traitements pharmacologiques sont administrés aux porcs afin de vérifier, en chambres d'organe, par des études de réactivité vasculaire, s'il y a amélioration de la dysfonction endothéliale dans l'espoir de limiter ou même de renverser le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche.

Compte tenu de mon implication dans ce double programme MD-MSc, le choix de ce projet suscitait mon intérêt tant au point de vue de la technique chirurgicale que de la recherche. Une revue de littérature complète a été faite afin de savoir quel médicament utiliser dans l'application de ce modèle déjà démontré.

Mon choix s'est donc arrêté sur l'atorvastatine, car c'est la statine la plus mondialement utilisée (CPS, 2008). Ses effets pléiotropiques n'avaient jamais été évalués dans un modèle porcin d'hypertrophie ventriculaire gauche. Les résultats avaient cependant été concluants chez les lapins au début de mon projet.

Ainsi, l'intérêt principal de ce projet était de vérifier si l'atorvastatine, par ses propriétés pléiotropiques, soit ses effets dépendant de l'endothélium, ses effets anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, antioxydants et anticoagulants, pouvaient résulter en une réponse favorable à l'amélioration de la dysfonction endothéliale.

Pour ce faire, l'évaluation des effets pléiotropiques principalement visés dans ce modèle soit l'effet dépendant de l'endothélium par la libération de monoxyde d'azote et l'effet antioxydant par l'inhibition des LDL-oxydés (favorisant les radicaux libres) et de l'angiotensine II ont été évalués par des « kits » d'analyse précis choisis en fonction de ces facteurs.

Toutes ces nouvelles techniques m'ont permis de me familiariser avec la recherche fondamentale et de développer un esprit critique tout au long de mon cheminement.

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires sont les principales causes de décès et de morbidité chez les Canadiens (Nair, 1989). Une caractéristique universelle des maladies cardiovasculaires est la dysfonction de l'endothélium vasculaire, altérant ainsi le contrôle de la vasodilatation, de la perfusion tissulaire, de l'hémostase et de la formation de thrombus (Rush, 2005).

La plupart des formes de maladies cardiovasculaires impliquent des changements vasculaires causés par l'athérosclérose dans la circulation coronarienne, cérébrale, rénale et périphérique. Ainsi, la compréhension de la dysfonction vasculaire et son rôle dans le développement d'anomalies aux organes cibles est d'un grand intérêt clinique.

La découverte de Furchgott et Zawadzki, il y a 28 ans, du rôle obligatoire de l'endothélium dans la relaxation vasculaire a révolutionné non seulement la physiologie cardiovasculaire, mais a aussi stimulé la compréhension du développement des maladies cardiovasculaires. Peu après les premières études concernant l'importance de l'endothélium, des preuves substantielles ont démontré que les réponses dépendantes de l'endothélium étaient altérées dans des modèles animaux et chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires. L'hypothèse de travail issue de ces observations est que la dysfonction des cellules endothéliales joue un rôle dans l'initiation et la progression des maladies cardiovasculaires. Une compréhension plus approfondie des mécanismes physiopathologiques est nécessaire afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les cellules endothéliales régulent et contrôlent activement le tonus vasculaire basal et la réactivité, dans des conditions physiologiques et pathologiques, en répondant aux forces mécaniques et aux médiateurs neurohumoraux par la libération d'une variété de facteurs relaxants et contractants. Par exemple, une des premières étapes de l'athérogenèse, via l'inflammation vasculaire, est l'activation des cellules endothéliales. Les vaisseaux exposés aux facteurs de risque développent une dysfonction endothéliale qui se manifeste par une fonction vasomotrice altérée secondaire à la diminution de la synthèse ou par une augmentation de la destruction du NO issu de l'endothélium. Donc, une réduction de l'activité du NO produit par l'endothélium contribue à une relaxation vasculaire diminuée, une aggrégation

plaquettaire augmentée, une prolifération accrue des cellules musculaires lisses vasculaires, une migration des leucocytes vers l'endothélium (Mombouli et Vanhoutte, 1999), et une activation du phénomène inflammatoire, pathologique (Furchgott, 1980).

CHAPITRE DEUXIÈME

L'ENDOTHÉLIUM VASCULAIRE

Anatomie des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales ont les mêmes caractéristiques que toutes les cellules du corps humain; un cytoplasme et des organelles disposés autour d'un noyau, contenus dans une membrane cellulaire. La membrane cellulaire est constituée d'une double couche de phospholipides séparée par un compartiment d'eau et traversée par des protéines complexes qui fonctionnent comme des récepteurs ou comme des canaux ioniques. Plusieurs protéines contractiles traversent le cytoplasme : l'actine, la myosine, la tropomyosine, l' α -actine et autres qui permettent les activités motrices (Esper, 2006).

Endothélium sain; fonctions

L'endothélium vasculaire est une couche monocellulaire localisée entre la lumière du vaisseau et les cellules musculaires lisses vasculaires. L'endothélium est métaboliquement actif et produit une variété de médiateurs vasoactifs. Parmi ces vasodilateurs, le monoxyde d'azote dérivé de l'endothélium est essentiel dans le maintien de l'homéostasie vasculaire (Vallance, 1992). L'endothélium joue un rôle majeur dans la régulation du système vasculaire et dans la fonction des organes (Nicholas, 1995). La position unique de l'endothélium est favorable pour contrôler la fonction de la paroi vasculaire, mais aussi celle des tissus environnants et ainsi influencer les médiateurs circulants. La couche cellulaire inhibe, par la libération de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium, la contraction, la migration et la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (Mann KG, 1997). L'endothélium inhibe aussi activement la coagulation par trois mécanismes soit l'héparine-antithrombine; la voie inhibitrice du facteur tissulaire et les anticoagulants (protéine C- Thrombomoduline). La matrice entourant l'endothélium contient du sulfate d'héparan à la surface cellulaire et des glycosaminoglycans qui favorisent l'activité de l'antithrombine III (AT-III) (Marcum, 1984) et stimulent la fibrinolyse. Ce sont deux phénomènes qui peuvent se former au niveau de la paroi du vaisseau. L'endothélium a un rôle anti-inflammatoire très important et contrôle l'adhésion et la migration des cellules inflammatoires à l'intérieur du vaisseau

sanguin. L'endothélium agit en ajustant les niveaux de médiateurs locaux et circulants par la relâche d'enzymes métaboliques extracellulaires et des enzymes de conversion telles l'endothéline, l'angiotensine, la bradykinine, la sérotonine, les catécholamines et l'adénosine (Furchgott, 1999). En effet, plusieurs stimuli incluant les forces de cisaillement et une variété de substances vasoactives endogènes produites de façon systémique ou générées localement peuvent activer les cellules endothéliales (Mombouli et Vanhoutte, 1999). Ces substances proviennent du système nerveux autonome (ACh, adénosine triphosphate (ATP), substance P), des hormones circulantes (catécholamines, vasopressine, angiotensine II (Ang II), insuline), des dérivés de la coagulation et des produits plaquettaires (sérotonine (5-HT), adénosine diphosphate (ADP), thrombine). D'autres substances sont générées au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (bradykinine (BK), ADP/ATP, angiotensine, histamine et ET-1) (Mombouli et Vanhoutte, 1999). L'endothélium joue aussi un rôle dans la régulation des organes par ses médiateurs qui peuvent directement influencer la contractilité myocardique et la fonction rénale. Les cellules endothéliales perçoivent les stimuli humoraux et hémodynamiques grâce à la présence de récepteurs membranaires, de molécules d'adhésion et d'enzymes leur permettant de changer de morphologie et de sécréter des facteurs relaxants dépendants de l'endothélium (Vanhoutte, 1997).

Les cellules endothéliales situées aux sites susceptibles de développer des lésions d'athérosclérose sont morphologiquement et fonctionnellement anormales (Flavahan, 1995) et ont perdu leur rôle protecteur. Elles expriment en effet des médiateurs pro-inflammatoires, procoagulants et antifibrinolytiques et stimulent la contraction, la migration, la prolifération des cellules musculaires lisses et contribuent à la modification proathérogénique des lipoprotéines. Ainsi, ces cellules endothéliales favorisent maintenant le développement des lésions athérosclérotiques d'où le terme dysfonction endothéliale (Nicholas, 1995).

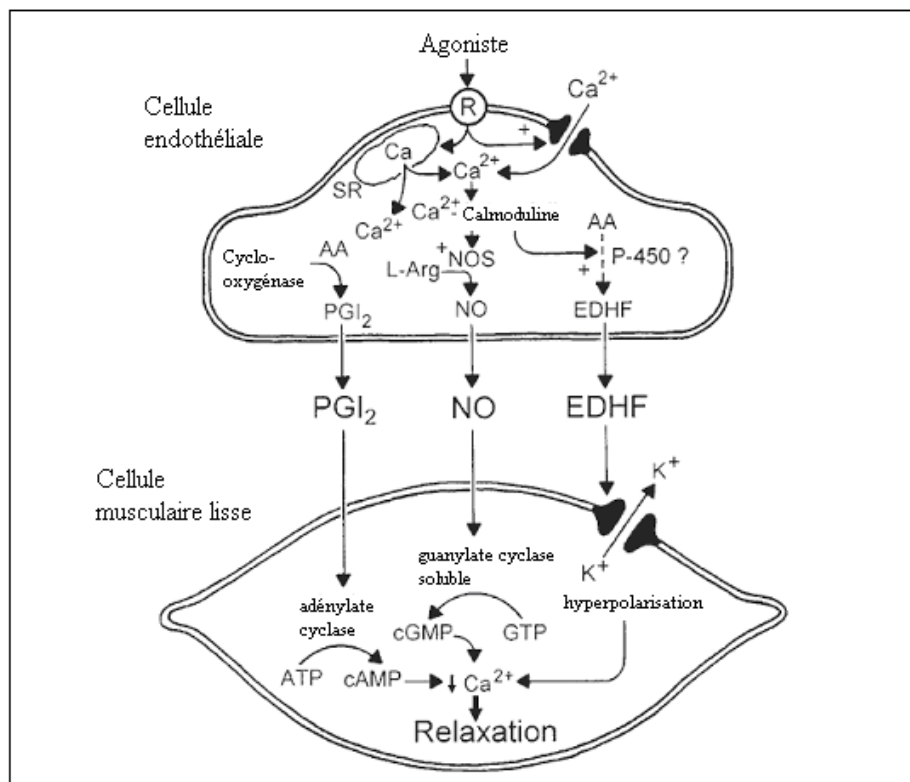


Figure 1: Schéma résumant la relâche des facteurs de relaxation des cellules endothéliales et leurs effets sur les cellules musculaires lisses (Vanhoutte, 2004).

Contrôle du tonus vasculaire

L'endothélium contribue au maintien du tonus vasculaire par la synthèse et la relâche des substances qui maintiennent l'homéostasie vasculaire. Une des fonctions les plus importantes de l'endothélium est la régulation du tonus vasculaire en favorisant une relaxation par l'action de substances vasodilatatrices telles EDRF / NO, la prostacycline ou la prostaglandine I₂ (PGI_2) (Biegelsen, 1999).

En 1980, Furchgott et Zawadzki ont démontré qu'un endothélium intact était requis pour obtenir une relaxation par l'ACh par la relâche du EDRF qui s'est avéré être le NO.

La protéine guanosine monophosphate cyclique (GMPc) est responsable de la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires. Le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) et le monoxyde d'azote (NO) se lient à la portion hème de la guanylate cyclase au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires et

augmentent ainsi la production de GMPc par la guanosine 5'-triphosphate (Ignarro, 1987). Donc, le GMPc active la protéine-kinase dépendante de la GMPc, qui phosphoryle la chaîne kinase légère de la myosine et régule l'activité de l'actinomyosine ATPases. La phosphorylation de la chaîne kinase légère de la myosine diminue l'affinité du calcium intracellulaire pour le complexe calcium-calmoduline et diminue donc la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, ce qui favorise la formation de myosine déphosphorylée moins active (Oates, 1988). La libération du NO exerce donc une forte action vasorelaxante, et inhibe potentiellement l'adhésion plaquettaire, l'activation, la sécrétion et l'agrégation par un mécanisme dépendant de la GMPc (Cannon, 1998). De façon similaire, la PGI₂, dérivée de l'endothélium, contribue aux propriétés vasorelaxantes de l'endothélium de façon plus efficace que le NO et inhibe l'agrégation plaquettaire par l'activation du récepteur IP présent sur les plaquettes (Baldwin, 2001). Le NO inhibe aussi l'expression de la P-sélectine à la surface plaquettaire, inhibe l'augmentation du calcium intraplaquettaire agoniste-dépendant et supprime le changement conformationnel calcium-sensitif de la glycoprotéine (GP) intégrine hétérodimérique IIb-IIIa requis pour la liaison du fibrinogène (Pigazzi, 1999).

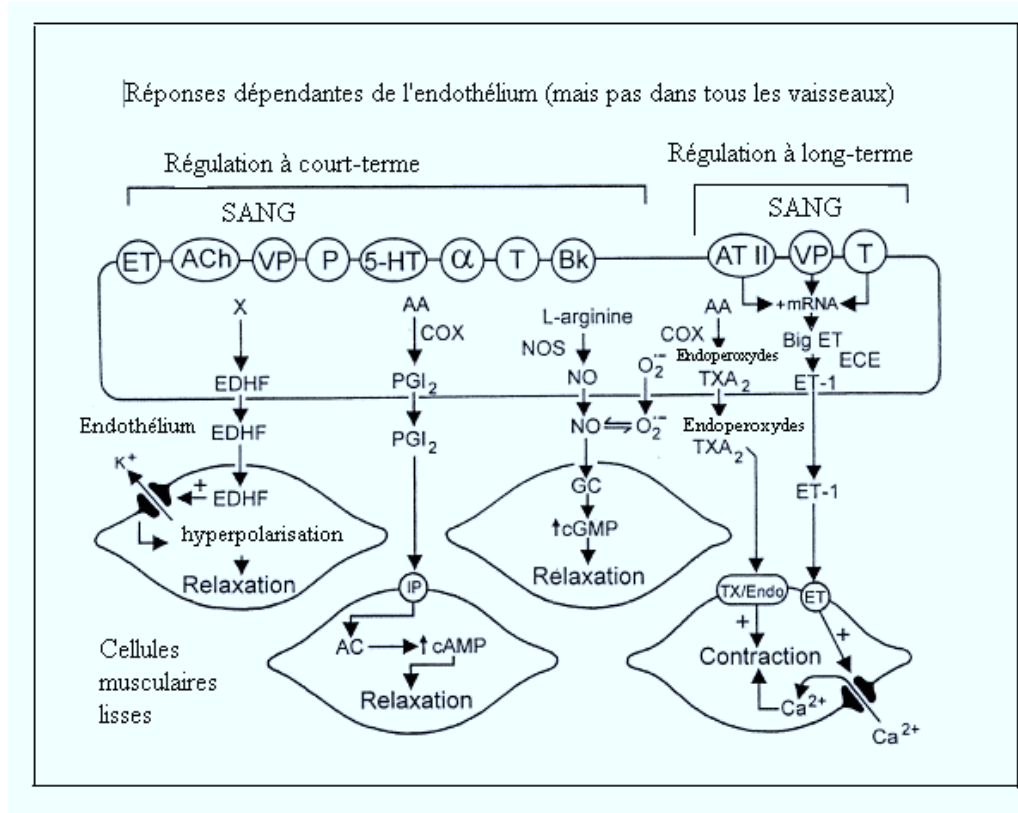


Figure 2: Multiplicité des facteurs relaxants et contractants dérivés de l'endothélium (Vanhoutte, 2000).

Contrôle de la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires

Les cellules endothéliales produisent des substances qui contrôlent la croissance des cellules musculaires lisses dans l'intima vasculaire. Les cellules endothéliales saines inhibent la croissance des cellules par la sécrétion des EDRF et de la PGI₂. La vasodilatation générée par le NO qui active la guanylyl cyclase et les analogues de la prostacyclines qui active aussi l'adénylyl cyclase, inhibe la croissance des cellules musculaires lisses en culture (Garg, 1989). Les EDRF et PGI₂ inhibent la relâche de facteurs de croissance comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), un facteur de croissance épidermique. Le protéoglycan et l'héparane sulfate, présents à la surface des cellules endothéliales inhibent aussi la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (Castellot, 1990). D'autres produits des cellules endothéliales stimulent la croissance des cellules musculaires lisses dont l'ET-1, l'ANG II, également le PDGF, le facteur de croissance

fibroblastique de base, le facteur de croissance « insuline-like », l'interleukine-1 et d'autres cytokines.

Facteurs vasorelaxants

Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote est une molécule non prostanoïde, labile, diffusible, possédant une demi-vie très courte (moins de 6 secondes), très réactive et qui sert à diverses fonctions dont la neurotransmission et la dégradation des bactéries. Le monoxyde d'azote est un messager intra et extracellulaire qui joue un rôle important dans la transmission des signaux neuronaux, la réponse immunitaire, la réponse inflammatoire, la modulation des canaux ioniques, les mécanismes phagocytaires, l'érection pénienne, l'homéostasie cardiovasculaire et la protection contre l'athérosclérose (Tuteja, 2004). En 1980, Furchgott et Zawadzki ont constaté que l'ACh causait une relaxation des vaisseaux sanguins par l'EDRF, qui s'est avéré être le NO, seulement si l'endothélium était encore intact. Les nitrates et dérivés nitrés étaient utilisés largement comme médicaments (nitroprusside, nitroglycérine) vasodilatateurs à court-terme, mais c'est seulement en 1987 que l'on a découvert que c'est le NO qui était relâché par les cellules endothéliales. Cette découverte a été appuyée par les travaux de Vallance et son équipe en 1989 lorsqu'ils ont démontré que l'injection d'un inhibiteur du NOS dans l'artère brachiale d'un humain causait une diminution marquée du flot sanguin.

Biosynthèse du monoxyde d'azote

Le NO est synthétisé biologiquement par des enzymes appelées NO synthases (eNOS) réduit (NADPH) et de l' O_2^- pour oxyder la L-arginine en citrulline et NO. Les NOS utilisent pour fonctionner un ensemble de cofacteurs: la tétrahydrobioptérine (BH_4) molécule impliquée dans les hydroxylations aromatiques (réalisées par exemple par la tyrosine hydroxylase), la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et un hème (protoporphyrine IX de fer). Il existe trois isoformes du NOS. NOS III, ou NOS endothéliale est une enzyme des cellules endothéliales

constitutives qui produisent continuellement de petites quantités de NO. La forme inductible à haute capacité, type II, et la forme constitutive neuronale, type I, sont les deux autres formes de NOS. L'exposition des macrophages, des CML et des CE aux cytokines telles IL-1 et TNF- α peuvent activer le NOS de type II, qui produit une grande quantité de NO durant les processus inflammatoires (Stamler, 1992). À faible concentration, le NO est un neurotransmetteur et un agent vasodilatateur, mais à de fortes concentrations il est impliqué dans la réponse immunitaire, comme agent cytostatique ou cytotoxique.

Régulation des espèces du monoxyde d'azote (NOS)

Le NOS-2 est exprimée dans la plupart des cellules nucléées des mammifères étudiés, sous l'action d'endotoxines (lipopolysaccharides) ou de cytokines (TNF, interleukines, interféron) *via* l'activation de facteurs de transcription tels que NF κ -B (Esper, 2006). Le NOS-2 n'est pas seulement inductible, car il est aussi exprimé continuellement dans l'épithélium respiratoire humain et dans les plaquettes ainsi que, de manière transitoire, dans les vaisseaux sanguins cérébraux au cours du développement du cerveau du rat (Esper, 2006). Inversement, l'expression du NOS-3 est modulée par les contraintes de cisaillement ou l'exposition aux œstrogènes. La distinction entre les isoformes constitutifs et les inductibles se fait par la régulation du couplage à la calmoduline (CaM). En effet, les NOS-1 et NOS-3 sont activés seulement après couplage à la calmoduline, qui intervient comme un interrupteur permettant le flot d'électrons au sein de l'enzyme.

L'activité de ces deux isoformes est donc influencée par la concentration du milieu en ions calcium qui assurent le couplage de la CaM, un cofacteur qui fonctionne comme un détecteur de concentrations de calcium intracellulaire, exerçant son activité uniquement en réponse à des grandes quantités de calcium intracellulaire (Esper, 2006). L'activité du NOS-2 est, en revanche, indépendante des ions calcium, car cette isoforme est fortement couplée à la calmoduline. De ce fait, le NOS-2 produit de manière continue du NO et l'absence de régulation par les ions calcium nécessite une expression adéquate de cette isoforme. La fixation de la calmoduline interviendrait aussi dans l'assemblage des monomères du NOS-3. La dimérisation pourrait donc constituer un autre moyen de régulation des NOS. Un

inhibiteur endogène de NOS-1 a ainsi été récemment mis en évidence, le PIN (protéine inhibitrice du NOS-1), il agit vraisemblablement en déstabilisant le dimère (Bloch, 2005).

La phosphorylation est également un mécanisme de régulation supplémentaire de l'ensemble des NOS, mais le rôle de cette modification post-transcriptionnelle n'est pas encore bien compris. La L-arginine peut exercer aussi un rôle dans la régulation de l'activité des NOS. Ainsi, comme certains cytochromes P-450, les NOS produisent, en l'absence de substrat, des ions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène, par transfert d'électrons du NADPH à l'O₂ *via* l'hème (transfert appelé découplage). La saturation en L-arginine provoque une diminution de la vitesse d'oxydation du NADPH d'un facteur de 2 à 3 pour le NOS-1, contre une augmentation d'un facteur de 4 à 6 pour le NOS-2. Pour le NOS-1, cette diminution est probablement due à la régulation par la concentration en calcium puisque le substrat ne manque pas en conditions normales de fonctionnement, le découplage se produit rarement. Pour le NOS-2, la diminution de la consommation de NADPH en déficit de substrat pourrait être un mécanisme limitant la production d'espèces oxydantes. En effet, l'apport en substrat pourrait influencer l'activité des NOS. La quantité de L-arginine disponible, et donc la production de NO, pourrait être modulée par l'arginase, enzyme qui transforme la L-arginine en urée et ornithine, et qui est présente dans les cellules endothéliales et les macrophages. De plus, la NOHA (N-oméga hydroxy-arginine) est l'un des inhibiteurs les plus puissants de l'arginase. Il pourrait donc exister une régulation croisée entre les deux systèmes enzymatiques métabolisant l'arginine; le NOS et l'arginase. Le NO lui-même inhibe les NOS: il peut en effet se fixer à l'atome de fer des NOS. Le complexe inactif résultant se forme transitoirement pendant la production de NO ce qui représente 80% de la forme totale de l'enzyme dans le cas du NOS-1. Ce complexe est instable en présence d'O₂ dont la concentration module l'activité du NOS-1. Ultimement, il y a formation de peroxynitrite suite à la réaction du NO avec l'ion superoxyde. Le NO est donc impliqué, après sa synthèse par les macrophages activés, dans la défense immunitaire. Enfin, lorsque le NO est synthétisé en trop grande quantité et converti en radicaux libres, diverses maladies peuvent survenir telle l'hypertrophie

ventriculaire gauche pathologique menant à l'insuffisance cardiaque secondaire au stress oxydant. Le GMPc est métabolisé par l'enzyme phosphodiesterase-5 (Pde-5) qui est localisée à proximité du NOS (Senzaki, 2001) et cet enzyme inhibe la sécrétion du NO.

Ainsi, l'identification des trois isoformes du monoxyde d'azote synthase dans les cardiomyocytes et la reconnaissance de l'importance de leur localisation cellulaire a grandement fait avancer la compréhension du rôle critique du NO dans la fonction myocardique. La délétion ciblée du NOS-3 a révélé un rôle fondamental de cet isoforme NOS dans la réponse structurale et fonctionnelle du cœur en réponse à une augmentation de pression et de charge résultant en une hypertrophie cardiaque (Bloch, 1989). De plus, les stimuli les plus importants pour la relâche du NO sont les forces de cisaillement causées par une augmentation de la vitesse du flot sanguin et menant à une vasodilatation proportionnelle à la quantité de NO relâché par l'endothélium. Cette vasodilatation est indépendante de l'endothélium. L'activation de NOS, par ces tensions sur les parois, implique un mécanisme indépendant du calcium et un mécanisme dépendant des tyrosines kinases. Outre sa fonction vasodilatatrice, le NO réduit aussi la perméabilité vasculaire et l'adhésion des monocytes et des lymphocytes, inhibe l'agrégation plaquettaire, l'oxydation et l'inflammation tissulaire, l'activation des facteurs thrombogéniques et la prolifération cellulaire (CML). Le NO inhibe aussi l'expression des cytokines proathérogéniques et pro-inflammatoires et favorise ainsi la fibrinolyse. Les activateurs pharmacologiques de cNOS sont l'acétylcholine, la bradykinine, l'histamine et le calcium ionophore. Il est démontré aussi que les lipopolysaccharides (LPS) peuvent causer une augmentation du cNOS par les cellules endothéliales par l'augmentation du cofacteur BH₄ (Vallance, 1992). L'importance du NO n'est pas seulement limitée à son rôle vasodilatateur, mais aussi à ses propriétés anti-plaquettaires et anti-agrégantes (Radomski, 1987). Le NO contraste les changements de perméabilité de l'endothélium et empêche aussi la prolifération des cellules musculaires lisses sous l'endothélium (Mellion, 1981). Mais ces fonctions peuvent devenir altérées ou disparaître lors de la dysfonction endothéliale. Tous ces rôles contribuent à un effet global protecteur contre le développement de

l'athérosclérose et de l'hypertrophie cardiaque qui peuvent mener vers l'insuffisance cardiaque (Esper, 2006).

La prostacycline (PGI₂)

La famille des éicosanoïdes comprend les prostaglandines (PGs), les thromboxanes (TX), les leucotriènes et les acides hydroxyl-éicosatétraénoïques formés par les acides gras à 20 carbones polyinsaturés, incluant le plus abondant et le plus proéminent des précurseurs biologiques, l'acide arachidonique (AA). La prostacycline PGI₂ est un vasodilatateur produit principalement par les cellules endothéliales de la paroi vasculaire et de façon moindre dans la média et l'adventice (Moncada et Vane, 1981). Sa synthèse dépend d'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Parsaee, 1992; White et Martin, 1989), survenant suite à une stimulation des CE par les forces de cisaillement, par l'hypoxie et par plusieurs médiateurs qui libèrent le NO tels que la thrombine, l'ADP et des cytokines telles TGF-β (Eldor, 1981). La PGI₂ est le produit majeur de la cyclooxygénase vasculaire, de la phospholipase A₂ et de la prostacycline synthase (Eldor, 1981). Cependant, contrairement au NO, sa libération est déterminée par l'expression de récepteurs spécifiques dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CML) (Halushka, 1989). Ainsi, dans des réseaux artériels qui n'expriment pas ces récepteurs, la prostacycline n'est pas relâchée (Kukovetz, 1979). Les récepteurs de la prostacycline sont couplés à l'adénylate cyclase pour augmenter les niveaux d'AMP cyclique intracellulaire dans les CML (Kukovetz, 1979). Par l'activation du récepteur IP présent à la surface de CML et des plaquettes, PGI₂ cause une vasodilatation et inhibe l'agrégation plaquettaire. De plus la PGI₂ facilite la libération du NO (Shimokawa, 1988). L'augmentation de la synthèse de PGI₂ endothéliale est due à la capacité de l'endothélium à générer une quantité 20 fois supérieure de PGH₂ (le précurseur de PGI₂), alors que les concentrations de PGI₂ synthétase sont identiques dans les CE et CML. Cette augmentation est liée à une concentration plus élevée de PGH₂ synthétase au niveau des CE (Eldor, 1981).

La PGI_2 possède deux actions prédominantes soient l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Radomsky, 1987) et la stimulation de la libération de NO des cellules endothéliales (Shimokawa, 1988). La synthèse de PGI_2 dépend d'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Parsaee, 1992; White et Martin, 1989), survenant suite à une stimulation des CE par les forces de cisaillement, par l'hypoxie et par plusieurs médiateurs reliés au NO tels que la libération de L-arginine et de BH_4 (Vanhoutte, 1997).

Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF)

L'acétylcholine (ACh) et d'autres vasodilatateurs dépendant de l'endothélium causent des hyperpolarisations dépendantes de l'endothélium et des relaxations qui sont dues au facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (Feletou, 1996). Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium favorise la relaxation des vaisseaux. Ce facteur agit sur l'ouverture des canaux potassiques de type grande conduction des CML vasculaires directement ou indirectement en hyperpolarisant les CE, facilitant le couplage électrique entre les CE et les CML (Triggle, 2002). Ceci crée une hyperpolarisation qui inhibe la vasoconstriction en fermant les canaux sodiques voltage-sensitifs empêchant ainsi l'activation du récepteur dépendant de la phospholipase C et occasionne la relâche subséquente de calcium des réserves intracellulaires (Itoh, 1994) tout en réduisant la sensibilité des protéines contractiles au calcium (Okada, 1993). L'identité chimique de l'EDHF n'a pas encore fait consensus. L'hétérogénéité des tissus et des espèces implique l'existence de plusieurs facteurs. Quatre hypothèses principales existent pour l'EDHF. Des preuves substantielles supportent l'hypothèse que des métabolites de l'AA partagent certaines propriétés avec l'EDHF. Les acides époxy-éicosatriénoïques (EET), métabolites de l'AA par la voie de P450 époxygénase, exercent une activité de l'EDHF dans certains lits vasculaires lors de la stimulation des récepteurs des CE. EET est alors synthétisé ou relâché des réserves de l'endothélium. Une fois relâché, EET diffusent à travers les CML et ils augmentent la probabilité d'ouverture des canaux potassiques à grande conduction activés par le calcium (BK_{ca}) et hyperpolarise les CML (Campbell, 2002). Alternativement, un autre produit de

l'AA, l'anandamide cannabinoïde endogène, peut agir comme l'EDHF dans les CE et CML et peut hyperpolariser les CML (Randall, 1996). Une troisième hypothèse implique les canaux potassiques comme l'EDHF; les récepteurs de l'endothélium stimulés activent les canaux potassiques de petite et moyenne conduction (SK_{ca} et IK_{ca}) activés eux-mêmes par le calcium et augmente la probabilité qu'ils ouvrent ceux des CE, ce qui entraîne l'efflux de K^+ des CE favorisant ainsi la relaxation du vaisseau.

L'adénosine

La formation de substances vasodilatatrices telles l'adénosine, le CO_2 , les composés de l'adénosine phosphate (ATP), l'histamine, les ions potassiques et les ions hydrogènes, est augmentée dans les tissus cellulaires lorsque le métabolisme augmente lors d'une demande cardiaque plus élevée chez un insuffisant cardiaque où la capacité de livraison d' O_2 et de nutriments diminue. L'adénosine et l'acide lactique sont libérés dans les cellules tissulaires lors d'une diminution de la concentration en O_2 (hypoxie) causant une vasodilatation des vaisseaux. Ces médiateurs deviennent donc importants pour la régulation du flot sanguin local lors de diminution de NO et de l'EDHF (Mombouli, 1999).

La bradykinine

La bradykinine cause une relaxation dépendante de l'endothélium (Furchgott, 1980). La bradykinine est le médiateur principal de la normalisation des fonctions endothéliales lorsqu'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACEI) est utilisé dans le traitement de maladies coronariennes. Les cellules endothéliales expriment les récepteurs de la kinine B_2 qui sont couplés à plusieurs voies de transduction. Ils activent la phospholipase C et favorisent la sortie du calcium des réserves intracellulaires et favorisent l'entrée de Ca^{2+} qui stimule la synthèse de NO. Les récepteurs B_2 agissent aussi via les mécanismes dépendants de la protéine tyrosine kinase afin d'induire la synthèse du NO via la libération de l'EDHF. Ils stimulent aussi la phospholipase A_2 , menant ainsi à la libération de l'acide arachidonique, le précurseur de plusieurs médiateurs vasoactifs, incluant la

PGI₂. (Guyton, 2006). Les kinines sont de petits polypeptides qui sont séparés par des enzymes protéolytiques dans le plasma ou dans les fluides tissulaires tels le liquide interstitiel. Une de ces enzymes protéolytiques est la kallikréine présente dans le sang et les fluides tissulaires tels que le liquide interstitiel et le plasma sous forme inactive. Lorsque cette même enzyme devient activée par l'inflammation tissulaire ou la coagulation, elle agit directement sur la globuline α -2, une cytokine immunorégulatrice, et relâche une kinine appelée kallidine qui est par la suite convertie par les enzymes tissulaires en bradykinine. Une fois formée, la bradykinine agit pour quelques minutes, car elle devient inactivée par l'enzyme carboxypeptidase ou par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. La bradykinine cause donc une puissante dilatation artérielle et une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins.

L'histamine

L'histamine est libérée essentiellement dans tous les tissus lorsque ceux-ci deviennent endommagés ou inflammés. La libération de l'histamine provient majoritairement des mastocytes dans les tissus et des basophiles dans le sang. L'histamine a un effet vasodilatateur puissant sur les artérioles et comme la bradykinine, elle a la propriété d'augmenter considérablement la porosité des capillaires permettant ainsi la sortie du fluide intravasculaire et des protéines plasmatiques dans les tissus (Guyton et Hall, 2006).

Les facteurs contractants dérivés de l'endothélium

L'endothélium peut être la source de substances relâchées qui induisent la vasoconstriction des vaisseaux sanguins. Celles-ci incluent les composantes du système rénine-angiotensine (SRA) soit l'ANG-I, l'ANG-II, la rénine, l'endothéline-1, les prostanoïdes vasoconstricteurs comme la thromboxane A₂ (TXA₂) et la prostaglandine H₂ ainsi que les radicaux libres tels que ONOO⁻, O₂⁻, OH⁻ (Mombouli, 1999), le facteur contractant dérivé de l'endothélium (EDCF) qui

est un métabolite de l'acide arachidonique, une endoperoxyde (Vanhoutte, 1989). Le facteur de contraction de l'endothélium le plus important est l'endothéline.

Les Prostaglandines/thromboxanes

Le métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase dans les cellules endothéliales peut mener à la sécrétion de prostaglandines H_2 (PGH_2), qui est le précurseur de tous les prostanoïdes incluant la TXA_2 (Moncada et Vane, 1979). La PGH_2 et la TXA_2 agissent sur les récepteurs endoperoxyde/ thromboxane dans les CML causant ainsi une vasoconstriction (Halushka, 1989; Coleman, 1994). Donc, dans des circonstances normales, l'influence d'une petite quantité de prostanoïdes peut être masquée par la production de prostacycline, de NO et de l'EDHF (Mombouli et al 1999). La relâche d'AA sert de substrat pour PGH synthase-1 et -2 aussi nommé cyclooxygénase (COX)-1 et 2; lipoxygénase (5-,12-, ou 15 lipoxygénase); ou les enzymes de P-450. COX-1 et COX-2 catalysent la conversion de l'AA en PGH_2 . Lorsque la plupart des tissus expriment COX-1 de façon constitutive, l'expression de COX-2 augmente de façon marquée seulement lorsque les cellules deviennent activées, exemple lors d'un processus inflammatoire (MacIouf, 1998). Or la synthèse de PGs varie selon les tissus ou le type cellulaire.

L'endothéline

Les anions superoxydes, endoperoxydes et thromboxane A_2 peuvent produire des peptides vasoconstricteurs. Ces peptides ont été découverts par Masaki et al et ont été appelés endothéline (ET). L'endothéline est un peptide vasoconstricteur puissant de 21 acides aminés et provient d'une famille qui compte trois membres: ET-1, ET-2 et ET-3. Chaque isoforme est le produit de gènes différents qui codent l'ARNm du précurseur protéinique. L'endothéline-1 est la principale endothéline produite par l'endothélium et est relâchée en réponse à divers stimuli, tels l'hypoxie, l'ANG II, la vasopressine, la NE, la BK et le TGF- β . L'endothéline n'agit pas seulement comme un vasoconstricteur, mais aussi favorise la synthèse des protéines et a également un effet mitogène sur les cellules musculaires lisses (Hirata, 1989).

L'ET-1 exerce ses effets biologiques en stimulant des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G, appelés ET_A et ET_B. Les CML expriment surtout les récepteurs à ET_A et en plus petites quantités ceux à ET_B. La stimulation des récepteurs ET des CML induit une vasoconstriction par deux mécanismes: l'augmentation de l'influx intracellulaire de calcium et l'activation des phospholipases C et A₂ (Schiffrin, 1998). Les CE ont des récepteurs ET_B qui, lorsque stimulés, favorisent la formation de NO et de PGI₂, une réaction qui peut servir de mécanisme de rétrocontrôle afin de restaurer le tonus vasculaire.

Les cellules endothéliales synthétisent la pro-hormone « big-endothéline » et exprime l'enzyme de conversion de l'endothéline qui est un vasoconstricteur puissant et qui est nécessaire pour le développement d'une activité vasculaire complète de l'endothéline -1 (ET-1) (Masaki, 1995). La sécrétion d'ET-1 peut être induite par la thrombine, IL-1, l'ANG II, le TGF-β1, les produits plaquettaires comme Gp IIb/IIIa et des neurohormones telles la vasopressine les catécholamines et l'hypoxie. Tous ces facteurs provoquent une augmentation de la concentration intracellulaire endothéliale de Ca²⁺ favorisant le processus de synthèse du peptide (Lüscher, 1996). Par contre, la synthèse de l'ET-1 par les CE est inhibée par la production basale et par la stimulation du NO (Masaki, 1995; Lüscher, 1996).

Aussi, la participation de l'ET-1 dans l'homéostasie vasculaire est mineure en condition physiologique et signe plutôt une pathologie lorsqu'exprimée en grande quantité, car l'endothéline n'est présente qu'en faible concentration chez les personnes saines. L'ET-1 plasmatique est augmentée dans l'hypertension pulmonaire, l'insuffisance cardiaque et les maladies des artères coronaires telles l'athérosclérose (Vanhoutte, 1994).

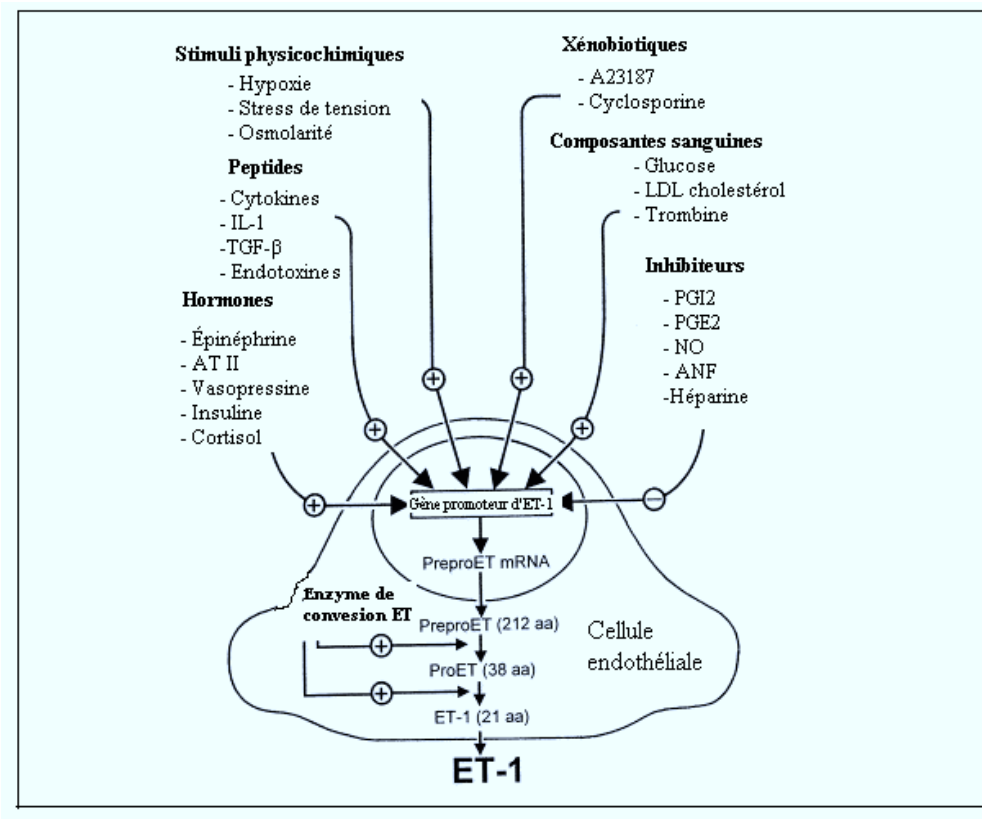


Figure 3 : Modulation de la production d'endothéline 1 (ET-1) (Vanhoutte, 2000).

L'angiotensine II

L'angiotensine est un peptide vasoactif qui exerce une variété d'effets sur les tissus et cellules vasculaires. L'ACE II est un homologue de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. L'ACE II est hautement présente dans le cœur de l'humain et des animaux et les données de la littérature suggèrent que l'ACE II soit un régulateur important de la fonction cardiaque in vivo. L'ACE est produit en majeure partie par les CE. En plus de convertir l'ANG I en ANG II, l'ACE dégrade et inactive la BK, un vasodilatateur potentiel et indirect, en favorisant l'activation du NO, d'EDHF, et de PGI₂. L'ANG II régule le tonus vasculaire dans un premier temps, par son effet vasopresseur direct sur les cellules contractiles, comme les CML, et via l'induction d'autres agents vasoactifs tels les molécules d'adhésion et d'autres cytokines sur les CE. Dans un second temps, l'ANG II exerce un effet sur le lit vasculaire qui est indépendant de la régulation du tonus vasculaire. La stimulation de l'ANG II sur la mitogenèse et la formation de protéines dans le muscle lisse vasculaire contribuent

à l'hypertrophie vasculaire (Feener, 1995). Les polymorphismes dans le gène de l'ACE sont reliés à l'hypertrophie ventriculaire gauche, certaines cardiomyopathies, à l'infarctus du myocarde et à la néphropathie diabétique (Feener, 1995).

L'ANG II agit en stimulant des récepteurs spécifiques. Chez l'humain, deux sous types ont été identifiés, AT₁ et AT₂. Les récepteurs AT₁ sont responsables des effets connus comme la vasoconstriction, l'augmentation de l'activité de l'aldostérone, l'hypertrophie myocardique, la prolifération des CML dans la paroi artérielle des vaisseaux, la réabsorption rénale du sodium, l'augmentation de l'activité noradrénergique en périphérie, la libération de vasopressine, la stimulation sympathique, la diminution du flot sanguin rénal. Les effets des récepteurs AT₂ sont moins bien connus, mais certaines études sur des humains et des animaux démontrent qu'ils seraient responsables de la vasodilatation des vaisseaux, de l'apoptose et de l'inhibition de l'angiogénèse. Les récepteurs AT₂ de l'angiotensine sont impliqués dans l'inhibition de la prolifération cellulaire au niveau des cellules endothéliales des artères coronaires (Stoll, 1995), donc possèdent les effets opposés à ceux des récepteurs à AT₁ (Esper, 2006). Une étude récente rapportée par Wansheng en 2006, a démontré que l'ANG II jouait un rôle dans la formation de fibrose vasculaire, qui mène à d'importantes complications dans l'hypertension et le diabète telles que les néphropathies, neuropathies et l'ASO. En particulier, l'activation de Smad 3, une protéine importante dans la voie de TGF- β , est un mécanisme par lequel l'ANG II favorise le développement de l'athérosclérose.

L'endothélium et le système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine (SRA) est une cascade de réactions enzymatiques qui résultent en la formation d'ANG II. La rénine produite par le rein, agit sur l'angiotensinogène, produit par le foie et le dégrade en ANG I, qui sera transformé par la suite par l'ACE dans la circulation ou les tissus et hydrolysé en ANG II (Guyton et Hall, 2006). Le SRA aide à maintenir la pression artérielle systémique. Une expérience typique démontre les effets d'une hémorragie sur la pression artérielle dans deux conditions différentes: une avec le SRA activé et l'autre avec le SRA non activé (le système a été interrompu par un anticorps bloqueur du SRA).

Les résultats démontrent qu'après l'hémorragie, la pression artérielle est remontée dans le cas où le système est fonctionnel. En revanche, lorsque le système est bloqué, la pression ne remonte que partiellement. Le SRA prend 20 minutes pour devenir complètement actif.

Le stimulus principal pour la sécrétion de la rénine par les cellules juxtaglomérulaires des reins chez les patients avec insuffisance cardiaque (IC) est la diminution de la pression de perfusion de l'artère rénale secondaire au débit cardiaque diminué, la diminution de la libération de sodium à la macula densa du rein secondaire à des altérations hémodynamiques rénales et finalement, par la stimulation directe des récepteurs B_2 juxtaglomérulaires par l'activation du système nerveux adrénergique.

Contrôle humoral de la circulation

Norépinéphrine (NE) et épinéphrine (E)

La NE est une hormone vasoconstrictrice puissante lorsqu'elle agit sur les récepteurs β_1 et α_1 . L'épinéphrine l'est un peu moins et peut parfois même causer une légère vasodilatation en agissant sur les récepteurs β_2 et α_2 (un exemple précis de cette vasodilatation causée par l'E est retrouvé dans la dilatation des artères coronaires lors d'une augmentation de l'activité cardiaque). Cette vasodilatation est causée lorsque des agonistes β_2 -adrénergiques, par exemple, stimulent la synthèse du NO par une augmentation intracellulaire de cAMP et lorsque des agents muscariniques activent la eNOS par le système (PIP)/ Ca^{2+} . Lorsque le système nerveux sympathique est stimulé dans la plupart des tissus pendant un stress ou à l'exercice, le système sympathique fait en sorte qu'il y ait une libération de NE qui contracte les vaisseaux. En plus, les nerfs sympathiques agissent sur les glandes surrénales et causent une relâche de NE et d'E dans le sang (Cardillo, 1997).

La vasopressine (ADH)

La vasopressine, aussi appelé hormone antidiurétique (ADH), est un vasoconstricteur plus puissant que l'ANG. Cette hormone est formée dans les cellules nerveuses de l'hypothalamus et est transportée à la périphérie par les axones des nerfs à la glande pituitaire postérieure, où elle est finalement sécrétée dans le sang. La vasopressine exerce un rôle majeur dans la réabsorption de l'eau des tubules rénaux contribuant ainsi au contrôle volémique et à la régulation de la TA.

Stress oxydant et radicaux libres

Les pro-oxydants (espèces oxygénées activées (EOA)) sont libérés suite à des stimuli tels les forces de cisaillement sur la paroi endothéliale, la libération de catécholamines, de sérotonine, de thrombine, d'histamine, de vasopressine, d'ADP et de BK.

Les EOA servent de seconds messagers qui activent plusieurs voies de signalisation dans les parois vasculaires. Or, l'abondance des EOA et particulièrement la génération excessive d' O_2^- , altèrent potentiellement plusieurs fonctions physiologiques importantes incluant la régulation du flot sanguin, la coagulation, l'inflammation et la croissance cellulaire (Griendling, 2000). Les EOA sont neutralisés par les antioxydants (vitamines, oligoéléments, enzymes). Le stress oxydant s'installe lorsqu'il y a déséquilibre en faveur des pro-oxydants. Ce stress oxydant est la source de nombreuses pathologies, telles que les complications du diabète, la bronchite chronique, l'arthrose, l'athérosclérose et le cancer. En plus du stress oxydant résultant de l'activité du métabolisme de l'humain, s'ajoute le stress oxydant lié aux radicaux libres provenant de l'agression tabagique, de l'alcool, de l'ozone, de la pollution atmosphérique (dioxyde nitreux) et des rayons solaires. D'autres situations comme une hyperactivité sportive peuvent aussi libérer des EOA en quantité excessive.

Au niveau lipidique, les membranes cellulaires riches en acides gras polyinsaturés vont subir une oxydation qui cause une altération de la fluidité et de la perméabilité membranaire. Au niveau des lipides du sang, l'oxydation des LDL aboutit à la

formation de LDL oxydés qui sont à l'origine de l'athérosclérose par la formation de plaques lipidiques entourées d'un cap fibreux. La mesure de cette oxydation s'effectue par le dosage d'anticorps de LDL oxydés. L'oxydation des protéines favorise leur fragmentation et leur dégradation. Ce processus est à l'origine de l'altération du collagène et de l'élastine qui se manifeste dans le vieillissement prématuré de la peau exposée au soleil. Au niveau du glucose, les acides gras libres estérifiés produits par l'oxydation du glucose, vont s'accumuler dans les vaisseaux, altérant leur élasticité et leurs fonctions normales. Les effets au niveau de l'ADN du noyau cellulaire, son altération entraîne une perturbation du code génétique. Le 8 OHDG (8-hydroxy-2-déoxyguanosine) est le marqueur du stress oxydatif de l'ADN. Au niveau des neutrophiles, il est possible de doser deux marqueurs: le MPO (myélopéroxydase) et l'élastase, agents importants dans le processus inflammatoire. Les neutrophiles sont impliqués dans les processus de défense immunologique, et lors de certaines situations pathologiques, ils vont libérer dans l'organisme des enzymes, telles que le MPO et l'élastase, des enzymes leucocytaires exprimées lors d'inflammation et de maladies cardiovasculaires.

Les radicaux libres de l'O₂ ou de l'azote ne sont pas uniquement toxiques. Au contraire ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires ou pour réguler les fonctions cellulaires. Leur toxicité résulte donc d'un excès de ces radicaux provenant d'un défaut de capacité antioxydante, ou d'une production massive par un emballement des mécanismes physiologiques ou d'exposition à des sources exogènes liées à l'environnement (tabac, alcool) (Jadot, 1988). Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux entraîne des lésions biochimiques aux macromolécules et cellules de l'organisme constituant le stress oxydant (Fridovich, 1986). Les dommages oxydatifs des lipides appelés peroxydation lipidique, perturbent le fonctionnement des membranes, provoquent des dépôts de lipides oxydés dans les vaisseaux ou les tissus âgés et génèrent des dérivés carcinogènes. Les attaques radicalaires de l'ADN sont sources de mort cellulaire, mais aussi de mutations carcinogéniques. L'oxydation des protéines dérègle les signaux cellulaires de prolifération ou de défense, inhibe des enzymes dont la

myélopéroxydase, la céruloplasmine et la lipoxygénase et génère des dépôts responsables d'amyloïdose et de fibrose (Hassan, 1988). Tous ces désordres biochimiques résultent du stress oxydant impliqué dans de très nombreuses maladies, soit en se comportant comme des facteurs déclenchants, soit comme une cause de complications dans leur évolution. Donc le stress oxydant est à la source de maladies souvent reliées au vieillissement tel le cancer. De plus, le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer et les maladies cardiovasculaires (Lange, 2004).

Xanthine Oxydase (XO)

La xanthine oxydase est une enzyme associée aux cellules endothéliales qui est une source de métabolites d' O_2 toxique qui est synthétisé principalement lors de la reperfusion des tissus ayant subi une ischémie. Dans des CE mises en culture suite à de brèves périodes d'anoxie, la libération de la XO endogène génère une augmentation de la concentration de l'anion superoxyde (O_2^-), causant ainsi une altération de la fonction cellulaire (Terada, 1992).

La xanthine oxydoréductase (XOR) favorise la production d'EOA dans le système cardiovasculaire. De plus, son activité est augmentée en IC, car les espèces oxygénées activées dont la xanthine oxydoréductase, augmentent dans cette pathologie cependant, on n'en sait pas le mécanisme moléculaire exact (Cappola, 2001). La XO peut générer du NO, des nitrites et des nitrates à pO_2 basse, mais la voie de signalisation in vivo n'est pas clairement expliquée à ce jour.

Peroxynitrite ($ONOO^-$)

Le peroxynitrite ($ONOO^-$) active l'activité de la cyclooxygénase, des prostaglandines, des endoperoxyde synthases constitutives et est induite en servant comme substrat pour l'activité peroxydase de l'enzyme. L'activation de l'enzyme purifiée est induite par l'ajout direct d' $ONOO^-$ ou par la génération in situ d' $ONOO^-$ par le NO couplé à l' O_2^- . Le Cu, Zn-superoxyde dismutase inhibe complètement l'activation de la cyclooxygénase dans les systèmes où l' $ONOO^-$ est généré in situ.

suite à sa liaison avec l' O_2^- . Ceci supporte l'hypothèse que le peroxynitrite est un modulateur important de l'activité de la cyclooxygénase dans les cellules inflammatoires et établit que l' O_2^- sert de lien biochimique entre la biosynthèse du NO et des prostaglandines PGH_2 .

L'anion superoxyde (O_2^-)

L'anion superoxyde (O_2^-), peut induire des lésions directes et localisées, car il ne traverse pas les membranes biologiques à cause de sa charge négative. Cependant, en règle générale, il n'est pas très réactif. Son élimination par dismutation, une réaction catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) est très efficace (Varma, 1990). Le produit de la réduction de l' O_2^- , soit le peroxyde d'oxygène (H_2O_2), traverse les membranes biologiques et peut induire des lésions plus importantes que l' O_2^- . Le H_2O_2 est catabolisé rapidement par la catalase et par les peroxydases mais en présence de métaux de transition (fer ou cuivre), la réaction de Fenton donne lieu à la formation du radical hydroxyl qui est hautement réactif et très instable. Le radical hydroxyl est probablement responsable de la majorité des lésions induites par le stress oxydant.

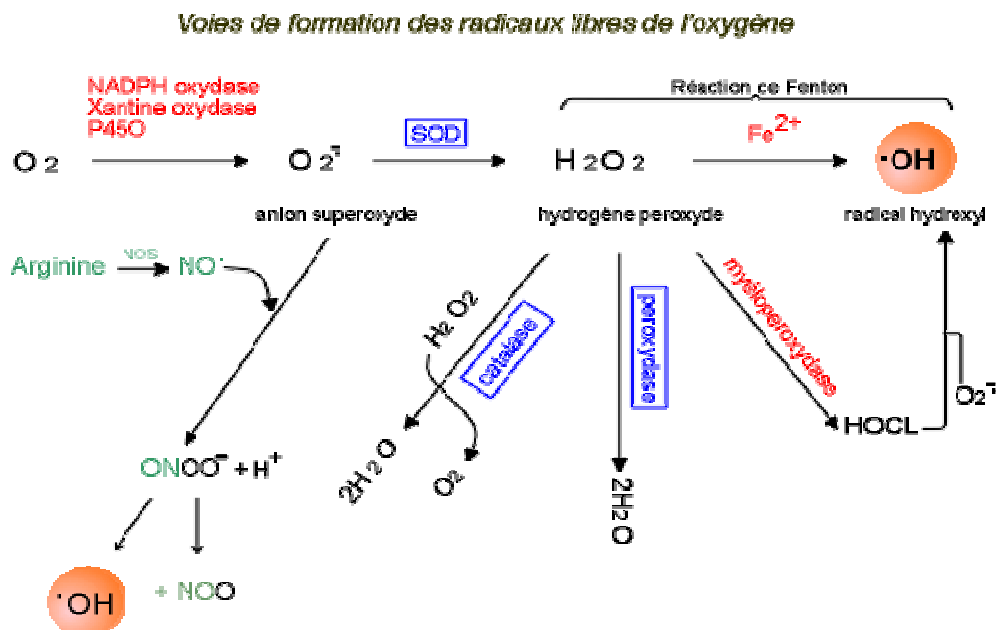


Figure 4: Voies biochimiques impliquées dans la production et le métabolisme de radicaux libres de l'oxygène (RLO) (Polla, 1999).

Le Glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous-unités qui contiennent chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. La glutathion peroxydase est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. Elle assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment de type ROOH en ROH.

Les produits oxydants et l'athérosclérose

Les produits oxydants, comme les anions superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), l'hydrogène peroxyde (H_2O_2), le radical hydroxyl ($\cdot OH$), l'acide hypochlorique ($HOCl$) et les radicaux des lipides sont produits suite au métabolisme aérobie normal. Ces molécules sont très réactives avec d'autres molécules telles le NO et les LDL oxydés et sont rassemblées sous le terme espèces oxygénées activées (EOA). Celles-ci peuvent être formées dans le cœur par une multitude de mécanismes différents, incluant la phosphorylation oxydative dans les mitochondries lors du processus normal

aérobie (Giordano, 2005). Un surplus d'EOA, principalement l' O_2^- , peut oxyder le NO et le transformer en peroxynitrite ($ONOO^-$), une molécule inactive qui peut mener à plus d'oxydation et endommager l'endothélium.

Les espèces oxygénées activées (EOA) et l'hypertrophie cardiaque

L'hypertrophie cardiaque peut être un mécanisme compensatoire et adaptatif (physiologique) ou un processus pathologique qui deviendra précurseur d'IC. La littérature démontre en effet que les EOA sont à la source de l'hypertrophie cardiaque. Plusieurs facteurs extracellulaires tels l'augmentation de la post-charge en réponse à une augmentation de la résistance vasculaire périphérique ou bien l'insuffisance mitrale sont capables d'induire l'hypertrophie des cardiomyocytes. De plus, plusieurs des voies de signalisation qui gèrent la réponse de la croissance hypertrophique à ces facteurs peuvent être directement ou indirectement activées par les EOA. Ces voies sont PKC; MAPKs p38, JNK, la voie de signalisation de l'apoptose qui implique des kinases (ASK-1), et ERK1/2; P13 K; Akt; et plusieurs voies des tyrosines kinases. Les sources cardiovasculaires majeures de EOA comprennent les enzymes xanthine oxydoréductase (XOR), NADPH oxydase, NOS les cytochromes mitochondriaux et l'hémoglobine (Ide, 1999).

CHAPITRE TROISIÈME

LE PROCESSUS DE FORMATION LIPIDIQUE

Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines (Apo) procurent une stabilité structurale aux lipoprotéines et déterminent le métabolisme des particules sur lesquelles elles agissent. Leur appellation est arbitraire (ordre alphabétique) et les principales sont: Apo A1 (composante structurale des HDL); Apo B (composante structurale des chylomicrons, VLDL et LDL); Apo C (qui peut inhiber la captation hépatique des chylomicrons et des résidus VLDL et activer la lipoprotéine lipase) et Apo E (le ligand pour lier quelques lipoprotéines aux récepteurs des LDL et composante structurale des VLDL) (Beucler, 1990). Les apolipoprotéines sont des glycoprotéines de masses moléculaires très variables de 550000 daltons pour l'apoB100 à 6500 pour l'apoC-I (Albers, 1992).

La répartition des apolipoprotéines dans les lipoprotéines

Les apolipoprotéines A-I ne se retrouvent que lorsque la personne est à jeun au niveau des HDL où elles représentent 65 % des apolipoprotéines, leur taux sérique moyen est de $1,4 \pm 0,3$ g/L. Les apoB100 se retrouvent exclusivement dans les lipoprotéines de basse densité : elles représentent 100 % des apolipoprotéines des LDL et une fraction mineure (30 %) dans les VLDL. Leur concentration dans le sérum est de $1 \pm 0,3$ g/L correspondant principalement à 90 % de celles des apoB des LDL. Les apoC (C-I, C-II, C-III) et les apoE, se répartissent entre les VLDL, IDL et les HDL. Les chylomicrons sont constitués d'apoA-I, A-II, C, E d'origine hépatique et des apoB48 et apoA-IV d'origine exclusivement intestinale. Les apolipoprotéines, par leurs points isoélectriques variés, donnent aux lipoprotéines des mobilités différentes en électrophorèse (Albers, 1992) : les HDL riches en apoA migrent parmi les α -globulines, ce sont les α -lipoprotéines. Les LDL, au contraire, migrent parmi les β -globulines et sont appelées β -lipoprotéines. Les VLDL migrent entre les α -lipoprotéines et les β -lipoprotéines : on les désigne par α_2 -lipoprotéines ou pré- β -lipoprotéines.

Le cholestérol

Le CH est un constituant important des membranes cellulaires et un précurseur biochimique des sels biliaires, des hormones stéroïdiennes et de la vitamine D. Il fait partie des régimes normaux et est également synthétisé *de novo* dans le foie et transporté via le sang, principalement sous forme d'acides gras estérifiés. L'hypercholestérolémie correspond à des niveaux sanguins de CH anormalement élevés.

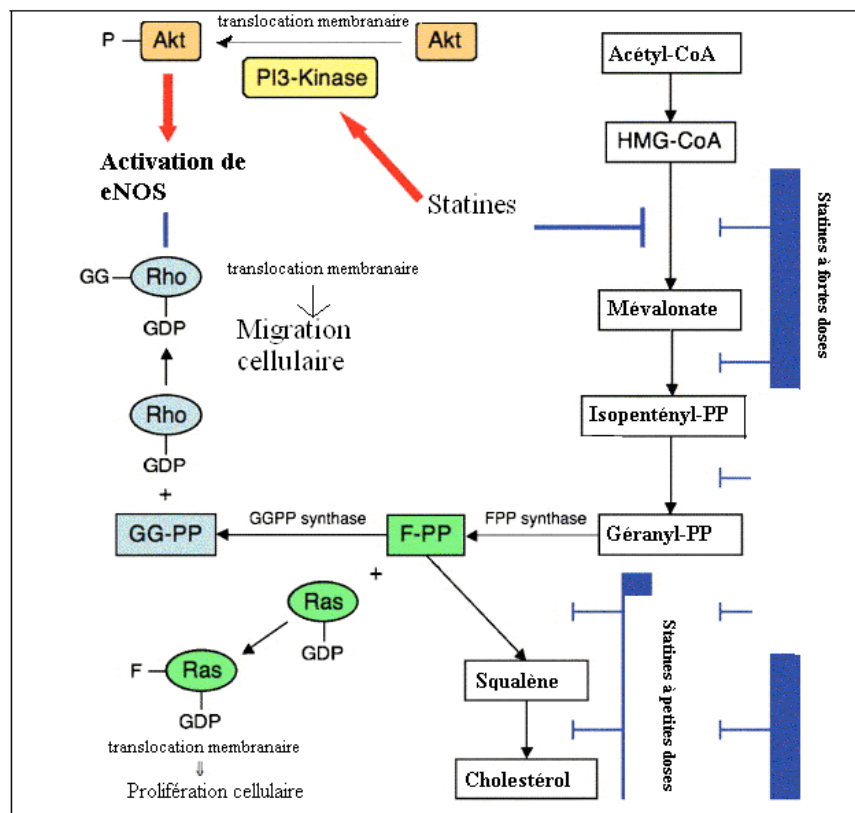


Figure 5: Cascade de synthèse du cholestérol avec des produits sans groupement stérol, FPP et GGPP, et sites d'action des statines (Masaaki, 2007).

Les triglycérides

Les triglycérides (TG) sont des esters composés de glycérol liés à trois chaînes d'acides gras. Ils forment environ 95% des tissus adipeux du corps et constituent

une importante source d'énergie dans le muscle. Les études de Framingham (Castelli, 1986) et d'Helsinki ont démontré que, dans la plupart des cas, des niveaux élevés de TG représentent un facteur de risque indépendant de maladies cardiovasculaires (MC) (Karpe, 1995).

L'hyperlipidémie

Chez les personnes souffrant d'hyperlipidémie, la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans les artères coronaires et dans les vaisseaux périphériques est altérée avant même le développement de l'athérosclérose. La restauration à la normale ou proche de la normale de la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans les vaisseaux de l'avant-bras de patients hyperlipidémiques peut survenir après 6 mois avec un traitement hypolipémiant (Vallance, 2006). Des anomalies au niveau des lipoprotéines sanguines et du dérèglement du métabolisme des lipides sont les facteurs de risque les plus souvent rencontrés dans l'athérosclérose (Harrison, 2003).

L'hyperhomocystéinémie

L'homocystéinémie est caractérisée par une augmentation de la concentration de l'acide aminé homocystéine contenant du soufre retrouvé dans le sang et l'urine. Des complications qui peuvent mettre la vie du patient en danger peuvent en résulter. L'apparition de problèmes coronariens, rénaux et cérébraux est fréquente. L'augmentation de la concentration plasmatique d'homocystéine est considérée comme un facteur de risque important pour le développement des maladies coronariennes secondaires à la dysfonction endothéliale qui lui est secondaire. Cette anomalie peut être renversée par la supplémentation en acide folique, supplément important pour la synthèse des bases nitrogénées dans l'ADN et l'ARN et qui sert de coenzyme (tétrahydrofolate) pour le transfert de 1-carbone, impliqué dans les réactions de méthylation (Vallance, 2006). Une étude de Liming en 2001 démontre qu'il y a une association entre l'homocystéine induite diminuant la formation du NO et une diminution des fonctions et de l'expression du transporteur de l'arginine en absence d'altérations de l'expression ou de l'activité de la eNOS. Ceci suggère

un rôle important des altérations des transporteurs de l'arginine lors de l'hyperhomocystéinémie. L'homocystéine, en réduisant la demande d'arginine, peut augmenter la dysfonction endothéliale secondaire à la génération d' O_2^- et à la formation de peroxynitrite ($ONOO^-$), qui augmente le stress oxydant en partie responsable de la dysfonction endothéliale. Les patients souffrant d'insuffisance rénale terminale démontrent une mortalité accrue reliée à des événements cardiovasculaires et cette condition est souvent accompagnée d'une hyperhomocystéinémie (Welch, 1998). Le lien entre l'homocystéinémie et les événements cardiovasculaires est bien établi, ainsi, des interventions pour diminuer les niveaux d'homocystéine diminueraient les risques de MC, e.g traitement à l'acide folique (Harrisson, 2003). La dysfonction des cellules endothéliales est associée avec des maladies cardiovasculaires majeures incluant l'hypertension, l'hypercholestérolémie, l'athérosclérose et l'hyperhomocystéinémie. Cette dernière est un facteur de risque indépendant pour le développement de maladies cardiovasculaires et se produit chez 5 à 7% de la population.

Le système immunologique et l'athérogénèse (ASO)

L'athérosclérose constitue une modification pathologique de la paroi artérielle, due à l'accumulation de lipides, de glucides complexes (amidon), de cellules (monocytes, macrophages) de tissus fibreux et de dépôts calcaires. Elle constitue principalement un risque d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux. Dans les pays développés, les pathologies liées à l'athérosclérose représentent la première cause de morbi-mortalité et constituent donc un enjeu important en termes de santé publique (Ford, 2002).

Étiologie de l'ASO

L'athérosclérose est une maladie évolutive secondaire à une exposition prolongée aux facteurs causals tels que l'âge, l'hyperlipidémie, l'hypertension, la sédentarité, le tabac ainsi que le stress oxydant. Ces derniers exercent leurs effets nocifs directement sur l'endothélium, contribuant à son activation pathologique et favorisant donc l'initiation de l'athérosclérose. Le système rénine angiotensine

(SRA) est un des protagonistes principaux dans la progression de l'athérosclérose chez les souris déficientes en apolipoprotéines E (ApoE).

La plaque d'athérome

Les lésions athérosclérotiques se forment initialement à des sites préférentiels de l'arbre vasculaire même si l'ensemble du réseau artériel est exposé à ces effets athérogènes. En effet, ces régions sont là où il y a un stress de tensions endothéliales faibles et oscillants telles les forces de cisaillement aux bifurcations d'artères. Un faible stress de tension règle l'expression de gènes (dont l'activité transcriptionnelle est contrôlée par des récepteurs nucléaires (PPAR, ROR, LXR)) au niveau de l'endothélium, des CML et de macrophages par des processus complexes de mécanotransduction et de mécanoréception induisant ainsi un phénotype athérogénique ainsi que la formation de plaques.

L'angiotensine II est un puissant vasoconstricteur qui favorise les lésions vasculaires, notamment par sa contribution à la prolifération et à la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLs) ainsi que par son rôle majeur dans le remodelage vasculaire, responsable en partie de l'instabilité des plaques (Higuchi, 2007). Une plaque instable est constituée de thrombi qui peuvent être occlusifs ou non. Ces plaques peuvent se rompre ou fissurer. Les thromboses d'artères coronaires se produisent aussi en l'absence de rupture de plaque, entraînant parfois des dommages à la paroi endothéliale et souvent associées avec des plaques fibreuses ou, moins fréquemment, avec des plaques fibroathéromateuses (Ball, 1994).

Stress oxydant et l'ASO

Des CMLs exposées à l'angiotensine II démontrent une augmentation de l'activation de la voie MAPKinase, une régulation à la hausse de la NADPH oxydase, principale responsable du stress oxydant au niveau vasculaire et finalement, une augmentation de l'expression des marqueurs inflammatoires tels que MCP-1 (protéine chimioattractante-1), VCAM-1 (molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1) et la P-sélectine. L'hypertension systémique et des facteurs

biomécaniques peuvent également entraîner une dysfonction endothéliale, la régulation à la hausse de l'expression génique des métalloprotéinases (MMPs) et des marqueurs inflammatoires tels CD₄₀L et COX-2, accélérant le processus pathologique. Cependant, la contribution exacte humorale et mécanique/hémodynamique à la physiopathologie est très controversée et demeure encore inconnue. L'ANG II est impliquée dans la pathologie de l'athérosclérose dans trois processus principaux: le stress oxydant, l'inflammation et finalement, le contrôle hémodynamique.

D'abord, l'angiotensine II cause ses effets délétères par la production d'anions superoxydes qui se lient au NO endothélial, génèrent du peroxynitrite (ONOO⁻) (Beckman, 1990). L'augmentation de la production des radicaux superoxydes en réponse à l'ANG II inactive le NO ce qui conduit à la dysfonction endothéliale, l'étape la plus précoce du développement de l'athérosclérose. À un stade plus avancé, il y a formation de stries lipidiques, caractérisées par une augmentation de l'oxydation des LDL et leur internalisation par les macrophages, conduisant ainsi à la formation de cellules spumeuses, processus favorisé par l'activation du récepteur AT₁ (Ross, 1999). En effet, l'activation du récepteur AT_{1R} par l'angiotensine II se solde par une régulation à la hausse de LOX-1 (Lectin-Like Oxidized LDL-Receptor-1) à la surface des cellules endothéliales et des macrophages ce qui augmente l'internalisation cellulaire des LDL oxydées et contribue à l'activation des macrophages aggravant la dysfonction endothéliale. De surcroît, des études in vivo humaines et animales suggèrent que l'ANG II est requise pour l'oxydation des LDL. Par exemple, le losartan, un antagoniste du récepteur AT₁, et le fosinopril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC), inhibent l'oxydation des LDL dans un modèle d'hypercholestérolémie murin ApoE « knockout » (Hayek, 1999). De plus, une association directe existe entre l'activation de la NADPH oxydase et la dysfonction endothéliale dans l'athérosclérose et ce, à tous les stades de la maladie. Plusieurs études supportent l'hypothèse que les effets délétères de l'angiotensine II, via son récepteur AT₁, implique la NADPH oxydase (Laplane, 2006).

Inflammation et l'ASO

L'angiotensine II contribue à l'expression accrue des molécules d'adhésion, permet le recrutement local des macrophages et des lymphocytes, favorisant et amplifiant ainsi l'inflammation. Les changements inflammatoires dans les artères athérosclérotiques prédisposent les patients à des événements ischémiques et thromboemboliques. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF- α et IL-1 β des macrophages activés par l'ANG II provoque des changements phénotypiques de l'endothélium qui passe d'un état anticoagulant à pro-thrombotique suite à la réduction du t-PA et l'augmentation des MMPs, endothéline-1, PAI-1, ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine, IL-6, IL-8 et MCP-1. Ces cytokines pro-inflammatoires, à leur tour, exercent une boucle de rétroaction positive par le recrutement de cellules mononucléaires (Weiss, 2001). Il y a alors amplification de l'inflammation et du stress oxydant dans les plaques athérosclérotiques et donc, progression vertigineuse de la maladie.

Facteurs hémodynamiques et l'ASO

À la surface de l'endothélium vasculaire, site commun d'action des facteurs de risque cardiovasculaire, les facteurs hémodynamiques tels : la pression, les forces de cisaillement, les turbulences de flots et la stagnation de l'écoulement influencent considérablement le transfert des LDL à travers la paroi et le temps de résidence des particules athérogènes. À l'état physiologique, les forces de cisaillement laminaire constantes dues au flot sanguin maintiennent les cellules endothéliales dans un phénotype anti-inflammatoire, antioxydant et anti-thrombotique. En revanche, l'activation inflammatoire de l'endothélium se produit de façon caractéristique au niveau de sites préférentiels dans l'arbre artériel, à savoir les bifurcations artérielles, les courbures à l'origine de branches collatérales où la surface endothéliale est soumise à des forces de cisaillement faibles ou négatives. Ces dernières peuvent directement induire une activation endothéliale par trois mécanismes: une perméabilité endothéliale accrue facilitant la pénétration des LDL athérogènes, une expression d'intégrines (ICAM-1, VCAM-1) à la surface endothéliale permettant le recrutement de la machinerie inflammatoire et finalement, une induction d'un stress

oxydant qui altère le tonus vasomoteur via une réduction de la biodisponibilité du NO. Les forces de cisaillement ont également été identifiées comme activateurs de la NADPH oxydase dans le modèle murin KO-ApoE (Hwang, 2003). L'augmentation de la pression sanguine locale peut donc activer la NADPH oxydase mais la situation inverse est tout aussi possible: la suractivation de la NADPH oxydase peut être responsable de l'augmentation de la pression sanguine par son effet inhibiteur sur le NO en favorisant le remodelage vasculaire.

Les altérations du flot sanguin local peuvent promouvoir ou réprimer directement ou indirectement l'expression des molécules d'adhésion. Les niveaux physiologiques du stress de tension laminaire module l'expression de gènes impliqués dans l'athérosclérose incluant les facteurs de croissance plaquettaire (PDGF- α , PDGF- β), le facteur de croissance TGF- β , les facteurs fibrinolytiques tels tPA et les molécules d'adhésion telles ICAM-1 et VCAM-1. Le stress de tension laminaire de repos règle, de façon différente du stress de tension, les gènes impliqués dans l'athérosclérose en augmentant l'expression de la cyclooxygénase inducible (COX-2), la superoxyde dismutase manganèse dépendante (Mn-SOD) et la eNOS.

Dysfonction endothéliale et l'ASO

La surexpression de molécules d'adhésion telle que VCAM-1 (molécule d'adhésion cellulaire vasculaire) à la surface endothéliale produit également une augmentation de l'attachement et de la migration des monocytes dans l'espace sous-endothélial. À ce site, l'athérogenèse est perpétuée par une série d'interactions entre les cellules inflammatoires, les CML et les fibroblastes dans un milieu saturé en LDL oxydés (Molavi et Mahta, 2004).

Parmi les éléments qui composent le cap fibreux, le collagène est présent en grande quantité et contribue significativement à l'intégrité structurale de la plaque et à sa résistance aux forces de cisaillement. Le collagène retrouvé dans les plaques est principalement de type I et III dérivé des précurseurs de protocollagène synthétisés dans l'intima par les CML. Les cytokines déterminent l'homéostasie du collagène. TGF- β et PDGF originent des macrophages et se localisent dans les plaques

athérosclérotiques, où ils favorisent la prolifération des CML et la synthèse de collagène. En même temps, les CML répondent aux IFN- γ dérivés des lymphocytes T en diminuant la déposition de la matrice. Les facteurs qui perturbent l'équilibre entre le taux de synthèse et le taux de dégradation des composantes matricielles, en général, et de collagène, en particulier, déterminent la vulnérabilité du cap fibreux à la rupture. Les lymphocytes-T sont particulièrement impliqués dans ce processus. Les lymphocytes-T activés se colocalisent avec les macrophages aux sites de rupture de plaques ou d'érosion de plaques athérosclérotiques, et les CML et leucocytes de ces régions, expriment l'antigène d'histocompatibilité HLA-DR, un index de l'activation de l'IFN- γ . Combiné avec l'IL-1 et TNF- α , IFN- γ peut mener à l'apoptose des CML. Ces observations suggèrent que la mort cellulaire induite par les cytokines contribue à l'instabilité des plaques en privant les lésions de CML. La dégradation de la matrice extracellulaire en réponse aux protéases ainsi que l'augmentation de la production des EOA sont à l'origine du recrutement et de la prolifération des CML (Molavi, 2004); ceci mène ultérieurement à un épaissement et à une augmentation de la rigidité de la paroi vasculaire (Vanhoutte, 1997). Ainsi, le NO libéré de l'endothélium doit traverser de plus grandes distances avant d'atteindre les CML (Vanhoutte, 1997), en plus d'être synthétisé en quantité moindre et d'avoir une biodisponibilité diminuée suite à sa neutralisation par l'O₂⁻. En effet, les métalloprotéinases qui dégradent la matrice sont classifiées selon la spécificité de leurs substrats tels que les collagénases, les gélatinases, les stromélysines et les MMP de type membranaire. Les membres de la famille des MMP peuvent dégrader toutes les composantes de la matrice extracellulaire. Les MMP sont généralement exprimées en zymogènes inactivés qui demandent un clivage oxydatif, autolytique ou protéolytique pour obtenir une conformation active. Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases, une famille d'inhibiteurs endogènes synthétisés principalement par les CML, contrôlent aussi l'activité des MMP en condition normale. En effet, des études démontrent que des niveaux élevés de plusieurs MMP sont retrouvés dans les plaques athérosclérotiques à des endroits riches en macrophages.

CHAPITRE QUATRIÈME

LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE

Pathogénèse de la dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale consiste en une réduction de la capacité de l'endothélium à maintenir l'homéostasie et contribue au développement de processus inflammatoires pathologiques aux maladies cardiovasculaires. Les manifestations de la dysfonction endothéliale sont la vasoconstriction, l'activation plaquettaire excessive, les thromboses, la diminution de la fibrinolyse et l'athérogenèse (Biegelsen, 1999). La dysfonction endothéliale est prédictive d'un risque élevé d'évènements athérosclérotiques. Des analyses multivariées sur des sujets avec maladies coronariennes et ayant des facteurs de risques traditionnels de maladie cardiovasculaires, révèlent que la dysfonction endothéliale des artères coronaires épigardiques et microvasculaires prédissent les évènements cardiovasculaires aigus chez les patients avec et sans maladie coronarienne (Bonetti, 2003).

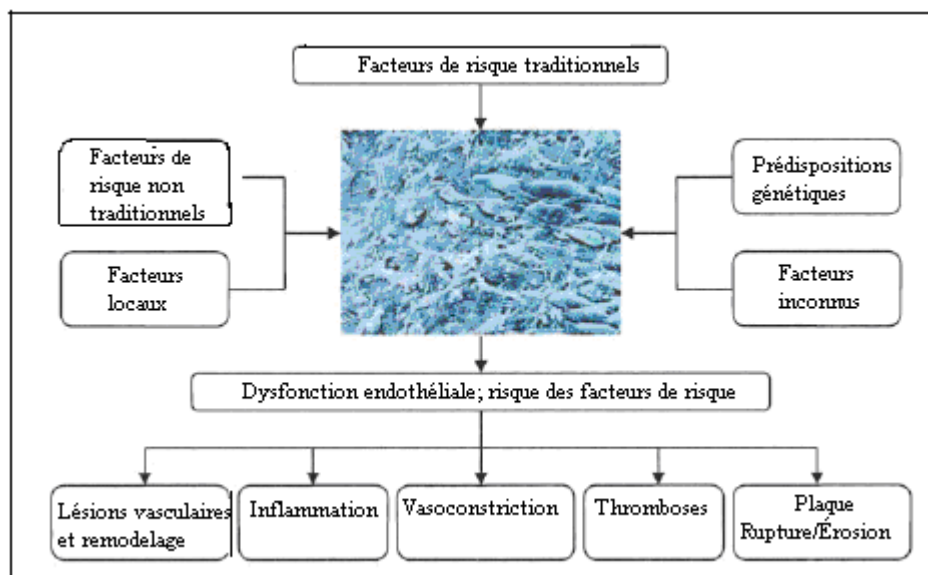


Figure 6: La dysfonction endothéliale et ses facteurs de risque (Bonetti, 2003).

La dysfonction endothéliale précède l'initiation de l'athérogenèse et est maintenant considérée comme un facteur de risque indépendant. La plupart des maladies athérosclérotiques se caractérisent par la détérioration des propriétés vasodilatatrices de l'endothélium (Vanhoutte et Boulanger 1997). La dysfonction

endothéliale se manifeste donc, soit par une diminution des médiateurs de la vasodilatation ou par une augmentation des médiateurs de la vasoconstriction et/ou une résistance des cellules musculaires lisses vasculaires de la paroi artérielle aux agents vasodilatateurs. Les médiateurs qui favorisent la relaxation endothéliale comme l'ACh, BK, 5-HT, ADP, UTP, la vasopressine et les catécholamines possèdent des récepteurs spécifiques à la surface des cellules endothéliales (Lüscher and Vanhoutte, 1986).

Ce déséquilibre mène à une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, qui représente en fait la caractéristique fonctionnelle de la dysfonction endothéliale. D'un autre côté, la dysfonction endothéliale se caractérise aussi par un état spécifique «d'activation endothéliale» qui favorise un milieu inflammatoire, prolifératif et pro-coagulant. En effet, les cellules endothéliales, lors de dysfonctions endothéliales, libèrent certains agents de façon prédominante. L'ET-1, un vasoconstricteur puissant, est libéré et favorise la vasoconstriction dépendante de l'endothélium et ceci résulte en une diminution de la libération du NO. Aussi, l'ANG II, un antagoniste du NO, est surexprimé résultant ainsi en une stimulation des facteurs de croissance et de prolifération, déclenchant le processus inflammatoire et sollicitant les cytokines inflammatoires et pro-athérogéniques. (Esper, 2006). Aussi, la production du NO et de d'autres agents vasodilatateurs pourrait être diminuée dans la dysfonction endothéliale, car il y a une diminution de la disponibilité de la L-arginine, le substrat nécessaire pour la synthèse du NO par la NO synthase (Cooke, 1991). Par ailleurs, mis à part la diminution de la production du NO, l'augmentation de la destruction ou du piégeage du NO et l'altération de fonction de l'EDRF sont d'autres causes d'anomalies de la motricité (Rosen, 1996). Une augmentation du stress oxydant, définit comme un excédant d'oxydants endogènes, par rapport aux antioxydants, sont aussi impliqués dans ce processus. Aussi, des altérations de la dimérisations de la eNOS et de l'inhibition compétitive de la eNOS par des inhibiteurs endogènes tels la diméthylarginine asymétrique (ADMA), peuvent mener au découplage de la eNOS favorisant la synthèse d'anions superoxydes au détriment du NO.

Lors de dysfonction endothéliale, le facteur tissulaire devient exprimé à la surface des cellules endothéliales suite à l'activation de la thrombine par la liaison des facteurs de coagulation Va à Xa à la surface des cellules endothéliales (Bonetti, 2003)

La dysfonction endothéliale est un élément clé dans la genèse des maladies cardiovasculaires. Elle est cependant très compliquée à mesurer objectivement. Cette mesure s'avère des plus nécessaires. Plusieurs marqueurs biologiques sont utilisés comme indicateur de dysfonction endothéliale dont les molécules d'adhésion solubles ICAM-1 et VCAM-1 qui augmentent dans les processus inflammatoires, mais qui sont peu spécifiques (Pearson and Vanhoutte, 1993). L'E-sélectine est spécifique à l'endothélium et est augmentée dans les maladies coronariennes et dans le diabète. Un des marqueurs spécifiques à l'endothélium est la thrombomoduline soluble qui augmente avec la sévérité des maladies coronariennes artérielles, les ACV ou les maladies occlusives artérielles périphériques (Blann, 1995). Conséquemment, la thrombomoduline diminue avec le traitement de l'hypercholestérolémie ou de l'hyperhomocystéinémie. En revanche le facteur de Von Willebrand est le meilleur marqueur inflammatoire dérivé de l'endothélium et prédit le risque d'ischémie cardiaque ou d'ACV (Constans, 2006). L'activation de NF- κ B joue également un rôle important dans la dysfonction endothéliale. NF- κ B comprend une famille de facteurs de transcription identifiés originalement dans les cellules B. Les régions promotrices de gènes transcriptionnellement régulés et exprimés dans les cellules endothéliales en réponse à des médiateurs inflammatoires tels LPS, IL-1 ou TNF- α contiennent des sites de liaison avec NF- κ B. Les gènes régulés par NF- κ B sont VCAM-1, E-sélectine, IL-1, -6, -8, TF, PAI-1, COX-2, et iNOS qui sont tous impliqués statégiquement dans l'activation de l'endothélium (Brand, 1996). L'inhibition de la production de NO endothélial basal peut activer NF- κ B et augmenter l'expression de ses gènes participant ainsi à la dysfonction endothéliale. Les cytokines pro-inflammatoires contribuent également à l'activation de NF- κ B (Khan, 1996).

La régénération de l'endothélium et la sénescence

En vieillissant, la vasodilatation dépendante de l'endothélium devient moins efficace chez les humains (Taddei, 1995, 1996). Dans les artères de rats âgés, la relaxation de l'endothélium en réponse aux nucléotides adénines est altérée due à une augmentation de la production d'endoperoxydes (Mombouli et Vanhoutte, 1993). Normalement, l'ET-1 induit la libération du NO et de l'EDHF, mais ce mécanisme ne fonctionne plus chez les rats âgés (Nakashima et Vanhoutte, 1993). Des expériences de dénudation endothéliale in vivo des artères coronaires chez le rat ont démontré que les cellules endothéliales peuvent se régénérer, mais perdent leurs propriétés à libérer du NO en présence d'agrégation plaquettaire, de thrombine, de 5-HT (Shimokawa, 1987, 1988).

La prédominance de la vasoconstriction sur la vasodilatation chez les cellules endothéliales régénérées s'explique également par une absence de libération du NO et de l'EDHF suite à la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs endothéliaux (Nakashima et Vanhoutte, 1993), par une augmentation de la production d'endoperoxydes (Mombouli et Vanhoutte, 1993) et par une augmentation de la production d'O₂⁻ par un processus dépendant de la COX (Shimokawa, 1999).

CHAPITRE CINQUIÈME

HYPERTROPHIE VENTRICULAIRE GAUCHE ET

DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE

Prévalence

L'hypertrophie ventriculaire gauche est présente chez 35% des personnes de plus de 60 ans dans la population générale (Guyton, 2006).

La physiopathologie de l'hypertrophie ventriculaire gauche

L'hypertrophie ventriculaire gauche consiste en l'épaississement du myocarde du ventricule gauche du cœur. L'hypertrophie ventriculaire gauche peut se développer naturellement, le plus souvent chez l'athlète, suite à des programmes d'exercices aérobiques ou de musculation. C'est ce que l'on appelle l'hypertrophie physiologique. Cependant, il existe un processus pathologique résultant en une hypertrophie qui peut mener vers l'insuffisance cardiaque.

L'hypertrophie cardiaque est secondaire à une augmentation du facteur de croissance VEGF par l'endothélium vasculaire dans le myocarde. L'hypertrophie ventriculaire gauche et le remodelage sont d'importants processus compensatoires qui se développent avec le temps en réponse à des charges hémodynamiques excessives qui peuvent être des surcharges de pression (sténose aortique) ou de volume (insuffisance aortique). L'hypertrophie ventriculaire se manifeste par deux caractéristiques principales dont: un ventricule gauche hypertrophié et asymétrique avec l'hypertrophie située majoritairement au niveau du septum interventriculaire. Deuxièmement, un gradient de pression dynamique du flot sanguin éjecté du ventricule gauche relié à un rétrécissement de l'aire sous aortique secondaire à l'apposition méso-systolique du feuillet de la valve antérieure mitrale contre le septum hypertrophié. Selon la loi de Laplace, le stress pariétal est habituellement augmenté dans l'insuffisance cardiaque, soit par l'augmentation de la taille du ventricule gauche ou par le besoin de générer une plus grande pression systolique pour compenser une post-charge excessive. Une augmentation soutenue du stress pariétal entraîne le développement d'une hypertrophie myocardique et une déposition accrue de matrice extracellulaire. La conséquence pathologique de l'hypertrophie n'est pas initialement une dysfonction systolique, mais plutôt une dysfonction diastolique due à une diminution de la compliance du muscle

hypertrophié qui est moins extensible. Cette surcharge chronique de pression entraîne une synthèse augmentée de sarcomères en parallèle avec ceux déjà présents, appelée hypertrophie concentrique. L'augmentation de la rigidité des parois hypertrophiées entraîne une augmentation de la pression ventriculaire diastolique qui se répercute sur l'oreillette gauche et à la vascularisation pulmonaire résultant à la longue en défaillance cardiaque.

Trois mécanismes sont impliqués dans la genèse d'un gradient de pression dynamique

1) l'augmentation de la contractilité du ventricule gauche, 2) la diminution du volume ventriculaire (pré-charge), 3) et la diminution de l'impédance aortique et de sa pression (Harrison, 2003).

Les conditions associées au développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche incluent une augmentation de la post-charge du ventricule gauche causées par la sténose aortique, l'insuffisance de la valve aortique et l'hypertension. D'autres causes sont les maladies primaires des muscles du cœur comme les cardiomyopathies hypertrophiques. Physiologiquement, la réponse hypertrophique est caractérisée par une augmentation du volume cellulaire des cardiomyocytes, une prolifération des cellules autres que les cardiomyocytes (principalement les fibroblastes), une activation de l'expression des gènes fœtaux (ANP, BNP) et des proto-oncogènes, une réorganisation des protéines contractiles dans les unités des sarcomères et une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (Marban et Koretsune, 1990). La synthèse accrue de mitochondries représente également un évènement cellulaire précoce suite à l'initiation de l'hypertrophie, probablement afin de compenser la demande en énergie des cardiomyocytes hypertrophiés (Braunwald, 1997). Les altérations des mécanismes de signalisation au niveau des CE impliquent préférentiellement les relaxations induites par des agonistes qui se lient à des récepteurs couplés aux protéines G_i plus modestement celles par les protéines G_q . La voie de l'EDHF est préservée alors que les relaxations induites par le NO sont diminuées dans les artères épicaardiques de porcs avec une HVG secondaire à 60 jours de cerclage aortique (Malo, 2003).

La diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium par le NO dans les modèles animaux d'HVG, a été attribuée à la diminution de la synthèse et/ou de la biodisponibilité du NO et du relâchement concomitant de facteurs contractants dérivés de l'endothélium tels l'endothéline-1 (ET-1) et de prostanoïdes vasoconstricteurs tels PGH_2 et TXA_2 (Wattanapitayakul, 2000). Le stress oxydant, principalement par l'action de l'anion superoxyde (O_2^-), joue aussi un rôle important dans la dysfonction associée à l'HVG (Cai, 2000) et dans l'hypertrophie des cardiomyocytes (Kakagami, 2003). En plus de diminuer les concentrations de NO, la dysfonction endothéliale diminue la libération de la prostacycline nécessaire à la vasodilatation dépendante de l'endothélium et l'inhibition plaquettaire (Guerra, 1989) ce qui entraîne aussi la dé-différenciation et la prolifération des CML vasculaires. L'exposition chronique des cellules musculaires lisses à des agents vasoconstricteurs tels la norépinéphrine et l'angiotensine II, peut mener à une dé-différenciation et à l'augmentation de la croissance des CML. Ce phénomène est possible suite au relâchement de facteurs de croissance tels PDGF et EGF (Haller, 1996). Les anomalies des fonctions de l'endothélium font en sorte que les patients hypertensifs sont plus susceptibles à la réduction du flot sanguin coronaire induit par les plaques athérosclérotiques des artères coronaires épicaudiques par la réduction des réserves coronaires vasodilatatrices et par des changements néfastes des structures vasculaires.

Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à l'augmentation du risque d'évènements coronariens chez les porteurs d'HVG dont l'augmentation de la masse du ventricule gauche, qui requiert plus d'oxygène pour sa perfusion tissulaire (Stangaard, 1987), en présence d'une diminution de la réserve du flot coronarien (Collins, 1990). La fibrose périvasculaire diminue le flot sanguin au myocarde et la détérioration de la fonction diastolique du ventricule gauche diminue sa perfusion (Kannel, 1987). Chez les patients hypertensifs, la dysfonction endothéliale et un contrôle anormal du tonus sympathique contribuent au risque plus élevé de maladies coronariennes. En particulier, la dysfonction endothéliale résulte d'une augmentation de facteurs vasoconstricteurs, thrombogéniques et prolifératifs qui augmentent la probabilité

d'événements ischémiques. De plus, le système cardiaque adrénergique joue un rôle primordial dans la régulation du flot sanguin. D'un côté, des patients hypertensifs démontrent une réponse sympathique exagérée aux stimuli physiologiques et d'un autre côté, les récepteurs β -adrénergiques impliqués dans la vasodilatation sont inhibés par l'hypertension. Finalement, l'obésité, la dyslipidémie, l'intolérance au glucose et l'hyperinsulinémie, qui sont fréquemment inter-reliés, représentent des facteurs de risque indépendants d'hypertension et d'événements coronariens.

Les causes de l'hypertrophie ventriculaire gauche

L'hypertrophie ventriculaire gauche peut être divisée selon trois composantes: la composante myocardique, la vasculaire et la neurale.

Composante myocardique

La composante myocardique de la résistance coronarienne est le reflet des forces qui jouent un rôle lors de la contraction myocardique et de la relaxation. L'hypertrophie myocardique augmente les forces compressives extravasculaires des vaisseaux coronariens qui constituent la composante extravasculaire de la résistance coronarienne (Stauer, 1979). De plus lorsque l'hypertension mène à l'HVG, la fibrose péri-myocitaire et péri-artériolaire augmente la composante myocardique de la résistance coronarienne par des changements des propriétés élastiques du myocarde (Weber, 1991). En plus, en présence d'HVG, les demandes métaboliques et en oxygène du myocarde augmentent la réserve de flot coronarien. Dans l'HVG concentrique, sans dilatation ventriculaire, la tension pariétale systolique basale, et donc la consommation en O_2 par le myocarde, ne sont pas augmentées ainsi le flot sanguin coronarien par unité de masse du myocarde est normal. En revanche, chez les patients avec HVG avec dilatation ventriculaire, le stress pariétal basal et la consommation en O_2 par le myocarde sont plus élevés et la réserve du flot coronarien est diminuée (Stauer, 1979).

Composante vasculaire

Des anomalies structurales et fonctionnelles des vaisseaux coronariens contribuent à la diminution des réserves vasodilatatrices. Chez les patients hypertensifs avec ou sans HVG, la vasodilatation indépendante de l'endothélium est altérée dans les artères coronaires épicaudiques et dans les vaisseaux de résistance.

Composante neurale

En plus de subvenir à la demande métabolique du myocarde, le flot sanguin coronaire est modulé par des influx adrénergiques cardiaques. Des barorécepteurs artériels exercent un rôle modulateur sur le tonus vasculaire des artères coronaires. Ces barorécepteurs sont très sensibles aux changements de pressions de remplissage du ventricule gauche et donc aux changements de la résistance coronarienne extravasculaire. Ces barorécepteurs ont une habilité à moduler de façon réflexe la résistance vasculaire coronarienne et ont donc un rôle important dans le maintien du flot sanguin coronarien.

Hypertrophie cardiaque et apoptose

L'hypertrophie cardiaque et l'apoptose sont des phénomènes impliqués dans le remodelage du cœur dans l'insuffisance cardiaque. Le NO peut exercer un effet apoptotique par la S-nitrosylation et ainsi inhiber les caspases 3 et 9, l'activité apoptotique des kinases 1 et c-jun N-terminal et l'activité transcriptionnelle de jun (Ide, 1999). Le NO peut aussi stimuler l'activité oxydoréductase de la thiorédoxine endothéliale par la S-nitrosylation d'un thiol allostérique, favorisant ainsi la préservation de l'équilibre du NO/rédox et prévenant ainsi l'hypertrophie cardiaque.

Sténose valvulaire aortique (SA)

La sténose aortique est la maladie valvulaire la plus fréquente qui affecte jusqu'à 4 % de la population de plus de 65 ans (Stewart, 1997). C'est la troisième maladie cardiaque la plus fréquente après l'hypertension artérielle systémique et les maladies artérielles coronariennes en Europe et en Amérique du Nord (Lindroos, 1994). La sclérose aortique, précédant la sténose, a été retrouvée chez

approximativement le tiers des ces patients. C'est une maladie progressive chronique qui commence par l'épaississement et la calcification des feuillets aortiques sans changement hémodynamique significatif initialement. Par la suite, des changements surviennent au fur et à mesure que les feuillets deviennent rigides et calcifiés résultant en une sténose sévère. C'est à dire que l'aire de la valve est réduite à un diamètre plus petit que 1cm^2 . Des études récentes ont démontré que la SA n'est pas seulement due à un processus dégénératif secondaire à un stress mécanique, mais aussi à un processus actif qui implique l'inflammation et l'infiltration de lipides similaire à l'athérosclérose (Yasuda, 2003). Des études épidémiologiques ont démontré que la sténose aortique et l'athérosclérose partagent plusieurs facteurs de risque tels que le sexe masculin, l'âge avancé, l'hypertension, le diabète, le tabagisme et un niveau élevé de LDL, de cholestérol et de lipoprotéines (Cowell, 2005). Grâce à ces observations des stratégies pharmacologiques déjà utilisées dans l'athérosclérose afin de traiter les facteurs étiologiques de la sténose aortique par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et des inhibiteurs de la coenzyme d'hydroxyméthylglutaryl A réductase (statines) ont été essayées comme traitement de la sténose aortique (Cowell, 2005). Les résultats de ces études sont conflictuels.

Stratégies thérapeutiques pour améliorer la dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est un phénomène potentiellement réversible et des stratégies ciblant la réduction des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires se sont avérées efficaces. Ces stratégies comprennent la diminution du cholestérol, les thérapies antihypertensives, l'arrêt du tabagisme, les thérapies de remplacement estrogéniques chez les femmes post-ménopausées, la supplémentation avec des acides foliques, des omégas-3 et des vitamines dont C et E ainsi que l'activité physique régulière (Bonetti, 2003).

Agents bénéfiques dans le traitement de la dysfonction endothéliale et de l'hypertrophie ventriculaire gauche

Les régulateurs de la libération du NO

Les Inhibiteurs de la iNOS

L'inhibition de la iNOS peut mener à une amélioration des changements hémodynamiques de la diminution de la dégradation du NO. (Vallance, 2001).

De plus, une surexpression de la iNOS dans un modèle de souris transgéniques favorise le développement de l'hypertrophie cardiaque avec insuffisance cardiaque secondaire. L'élévation des concentrations de cytokines inflammatoires ou d'endotoxines plasmatiques entraîne une augmentation démesurée de l'ARNm de la iNOS et de protéines dans pratiquement toutes les cellules nucléées. En conditions de déficience en BH₄ et en L-arginine, une augmentation de la iNOS transforme l'oxygène moléculaire en anion superoxyde (O₂⁻), un EOA. Ces intermédiaires de nitrogène réactif formés par la réaction entre NO et O₂⁻ deviennent des substances toxiques entraînant des dommages tissulaires importants (Imran, 2003).

Le tétrahydrobioptérine (BH₄)

Malo en 2003 a démontré qu'un traitement aigu in vitro avec le tétrahydrobioptérine (BH₄) ou qu'un supplément d'antioxydants avec la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) améliorent la réactivité vasculaire en présence d'une dysfonction endothéliale associée avec l'HVG (Malo, 2003). En effet, l'absence ou l'insuffisance de BH₄, un cofacteur essentiel pour le fonctionnement de la eNOS, empêche le couplage de l'enzyme. En effet, l'oxydation intracellulaire de BH₄ induite par les EOA dont les anions superoxydes et les peroxynitrites, mène au non-couplage de la eNOS qui devient une source d'anions superoxyde au lieu du NO.

La combinaison hydralazine-nitrate

La combinaison de l'isosorbide dinitrate et d'hydralazine comme traitement pour l'insuffisance cardiaque est utilisée afin de maintenir l'homéostasie de NO/rédox

(Sanders, 1997). L'hydralazine et le NO inhibent la NADPH oxydase augmentée lors d'IC, et l'hydralazine inhibe aussi la production d'EOA. Cependant, ces hypothèses doivent être étudiées plus intensivement.

Les Salicylates donneurs de NO: NCX-4016

Des molécules dérivées des salicylates (précisément le NCX-4016) et du NO ont des processus de formation semblables suggérant que ces deux composés sont relâchés simultanément avec les mêmes effets bénéfiques (Grosser et Schroder, 2000). La relâche du NO par le NCX-4016 in vivo semble être dépendante du temps et de la concentration, car il partage une voie avec le trinitrate de glycérol activant la GMPc. Les cellules endothéliales internalisent donc le NCX-4016 et la relâche du NO se produit dans le même compartiment intracellulaire que le NO produit de façon endogène par les synthases du NO (Fiorucci, 2002). De plus, le NCX-4016 inhibe la formation de superoxyde et l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase induit par les endotoxines et cytokines dans les parois vasculaires.

La thérapie génique

Le transfert direct du gène isoforme du NOS à la paroi vasculaire pourrait améliorer les fonctions vasomotrices et avoir un rôle dans le traitement des maladies cardiovasculaires. (Vallance, 2006).

Les inhibiteurs du stress oxydant

Les inhibiteurs de la XO

L'allopurinol et l'oxypurinol sont deux inhibiteurs de la XO prescrits généralement lors du traitement de la goutte. Ces médicaments devraient être étudiés de façon plus intensive dans la dysfonction endothéliale puisque qu'ils inhibent la XO, responsable du stress oxydant au niveau endothélial.

Le traitement aux folates

L'homocystéine provoque un stress oxydant intracellulaire au niveau de l'endothélium vasculaire menant à l'inactivation du NO ainsi qu'à la formation d'ONOO⁻ et à la diminution de la production du NO. Un traitement à l'acide folique améliorerait la dysfonction endothéliale et limiterait le développement de l'athérosclérose. Plus spécifiquement, le 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-MTHF), le métabolite circulant de l'acide folique, serait associé à la fonction endothéliale, indépendamment des niveaux d'homocystéine thiolactone (tHcy), supportant un effet direct de cette molécule sur la fonction vasculaire (Lange, 2004).

Les antioxydants

Le probucol

Le probucol, un antioxydant synthétique lipidique soluble peut retarder la progression de l'athérosclérose (Jialal, 1991). Il a été mis sur le marché dans les années 60 puis a été retiré en 1995 suite à un échec à une étude clinique de prévention (PQRST) à cause d'effets secondaires importants tels la rhabdomyolyse. Cependant, en 1997, des chercheurs de l'Institut de Cardiologie de Montréal ont démontré qu'en administrant du probucol à un patient ayant eu une intervention de dilatation percutanée des artères coronaires, il est possible de prévenir la resténose de celles-ci (Tardif et al, 1997). Sa capacité à inhiber l'athérogenèse est due à son activité antioxydante. Le probucol possède un potentiel antioxydant au niveau cardiaque. De fait, un traitement de 1mg/kg/j pour 80 jours entraîne une amélioration de plusieurs processus régulés par le potentiel rédox dans un modèle d'IC suite à la ligature de l'artère coronaire antérieure gauche chez le rat. Ces effets incluent une diminution partielle de la fibrose et de l'apoptose cardiaques, une inhibition de l'hypertrophie des cardiomyocytes, une diminution de la dilatation ventriculaire et une amélioration du remodelage du ventricule gauche (Sia, 2002). Le probucol augmente de façon significative la résistance des LDL au stress oxydant (Sasahara, 1994). Le probucol possède aussi un effet hypolipidémiant, tel que démontré par sa capacité à diminuer les niveaux circulants de LDL (par une

modification des caractéristiques des LDL, induisant une augmentation de leur catabolisme), de HDL, de cholestérol total et de triglycérides (Kakuta, 1994). Par contre, cette capacité n'est guère impliquée dans la modulation favorable du vaisseau suite à l'angioplastie, ni dans l'inhibition de la progression de l'athérosclérose chez les lapins Watanabe génétiquement hypercholestérolémiques (Berk, 1989). De fait, le probucol agit à ces deux niveaux par sa capacité de réendothélialisation, d'inhibition de la sécrétion de l'interleukine-1 par les macrophages (Anderson, 1995) et surtout par ses propriétés antioxydantes telles que la prévention de l'activation des macrophages et des métalloprotéinases, de l'oxydation des LDL et du développement de la dysfonction endothéliale (Berk, 1989).

La vitamine E et la vitamine C

La vitamine E, ou α -tocophérol, est un antioxydant endogène lipophile, présent dans les LDL ainsi que dans les membranes cellulaires (Burton et Ingold, 1989). Un supplément diététique administré dans des modèles expérimentaux d'hypertension tels les rats spontanément hypertensifs (SHR), diminue la peroxydation des lipides plasmatiques et améliore le statut antioxydant total. Un supplément en vitamine E améliore également la fonction endothéliale au niveau de la circulation de l'avant-bras de patients diabétiques, hypercholestérolémiques et atteints d'une maladie cardiovasculaire (Britten, 1999). Par contre, l'administration de la vitamine E seule est potentiellement néfaste puisqu'elle est peut être oxydée en radical tocophéroxyl, qui augmente la peroxydation lipidique (Landmesser et Harrison, 2001). La vitamine C agit en agent réducteur avec un radical de la vitamine E pour produire de la vitamine E. Contrairement au radical de la vitamine E, le radical de la vitamine C n'est pas une espèce réactive car son électron non-pairé est stable énergétiquement. Par la suite, le radical de la vitamine C est reconverti en vitamine C grâce au GSH (glutathion). Le GSH est synthétisé à partir du glutamate, de la cystéine et de la glycine. Le GSH est une composante majeure des défenses antioxydantes cellulaires et possède les caractéristiques suivantes : 1) le GSH de l'alimentation peut être partiellement absorbé par le petit intestin et peut être

synthétisé *de novo*, c'est donc un antioxydant endogène et exogène, 2) le radical GS^\bullet formé lors de l'oxydation du GSH est un radical prooxydant, il peut également réagir avec un autre GS^\bullet pour former le GSSG, lequel sera réduit en GSH par la GR dépendante du NADPH, 3) le GSH peut réagir avec une grande variété de composés électrophiles xénobiotiques, des réactions catalysées par des glutathion-s-transférases, 4) le GSH élimine efficacement les EOA directement et indirectement par des réactions enzymatiques, 5) le GSH peut se conjuguer avec le NO pour former des produits S-nitroso glutathion, qui sont alors clivés par le système thiorédoxine qui relâche alors du GSH et du NO, 6) le GSH interagit avec les glutarédoxines (protéines thiol), qui jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie cellulaire de redox.

Les hypolipémiants

Acyl-CoA: cholestérol acyltransférase

Plusieurs cibles potentielles dans le métabolisme des lipides pourraient être importantes dans la régulation de la fonction endothéliale. L'acyl-CoA: l'enzyme cholestérol acétyltransférase (ACAT), découverte en 2000 est impliquée dans l'estérification intracellulaire du cholestérol. Dans une première étude clinique, l'inhibition d'ACAT améliore la fonction endothéliale des vaisseaux de résistance chez des patients avec hypercholestérolémie malgré un effet minime sur le cholestérol (Kharbanda, 2005).

Ce qui nous mène au chapitre sixième qui résume les effets pléiotropiques bénéfiques des statines sur la dysfonction endothéliale qui sont regroupés en catégories telles que mentionnées ci-haut (i.e des effets dépendant de l'endothélium, anti-inflammatoires, antioxydant, anti-thrombotique et anticoagulant), d'où le choix de ce médicament pour mon projet.

CHAPITRE SIXIÈME

LES STATINES ET LEURS EFFETS PLÉIOTROPIQUES; EFFETS SUR LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE

Les effets des statines

Les statines sont les médicaments les plus prescrits dans le monde pour diminuer les niveaux de cholestérol. Utilisées depuis plus de 15 ans, les statines ont démontré leur efficacité, sécurité et tolérance chez un nombre élevé de patients (Calabrò, 2005).

Le premier inhibiteur de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase (statine) a été isolé dans une culture de *Penicillium* et s'est d'abord appelé compactine, puis mévastatine. Différent de la mévastatine par la seule présence d'un groupement méthyl, le premier agent utilisé en clinique a été la lavastatine, isolée à partir de cultures d'*A. Terrus*. La pravastatine est obtenue à partir de *P. Citrum*; la simvastatine est produite synthétiquement par fermentation d'un composé dérivé d'*A. Terrus*. L'atorvastatine et la fluvastatine sont entièrement synthétiques.

Le nombre de travaux cliniques étudiant les effets des statines sur les maladies coronariennes ainsi que leurs effets pléiotropiques connaissent présentement un grand essor dans le monde de la recherche. Les effets pléiotropiques des statines sont reliés à la diminution de la production des isoprénoides, qui sont responsables de la modification post-translationnelle des protéines, dont la diminution de la prénylation et donc de l'activité des petites protéines G (Ras, Rho) (Werner, 2004). Les statines favorisent la restauration de la dysfonction endothéliale par la formation de cellules endothéliales progénitrices, par l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, par son influence anti-thrombotique sur l'activité plaquettaire et dans la stabilité des plaques athérosclérotiques et finalement en diminuant l'inflammation vasculaire (Calabrò, 2005).

Les résultats sont convaincants et il est établi que les statines sont bénéfiques dans le traitement de la maladie cardiaque coronarienne (Waters, 2006). Une diminution de 1% des LDL diminue les événements coronariens de 1%. À hautes doses, les LDL ainsi que les maladies coronariennes peuvent être diminuées d'environ 50%. A dose élevée, l'atorvastatine contribue à la diminution précoce des effets néfastes provoqués lors de SCA par des effets anti-inflammatoires (Steinberg, 2004). Or, ces données relèvent d'un défi dans la pratique clinique, car plusieurs patients recevant

des statines sont sous traités, sur traités ou leurs traitements ont été arrêtés trop précocément et ne bénéficient pas de ces effets (Waters, 2006).

Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase

Les statines sont des inhibiteurs compétitifs de l'enzyme HMG-CoA réductase qui convertit l'HMG-CoA en acide mévalonique, une étape préliminaire et déterminante dans la biosynthèse du cholestérol (CH). Cette inhibition diminue la biosynthèse intracellulaire de CH, ce qui entraîne une augmentation de la production de récepteurs hépatiques des LDL, par transcription de l'HMG-CoA réductase. (Witztum, 1989). Le CH est fourni à la cellule par synthèse *de novo* et par retrait des LDL du sang par l'intermédiaire des récepteurs des LDL. L'effet des statines sur les niveaux plasmatiques des LDL nécessite 4 à 6 semaines à se manifester. Le foie est l'organe cible des statines étant le site principal de la biosynthèse du CH, de la production de lipoprotéines et du catabolisme des LDL. La biosynthèse du CH dans les tissus extrahépatiques est nécessaire pour le fonctionnement normal des cellules. Les effets nocifs des statines lors d'un traitement à long terme dépendent de leur niveau d'activité dans les tissus extrahépatiques. Ainsi, des variables de la pharmacocinétique telles que l'extraction hépatique et la distribution de doses systémiques et des composés actifs doivent être prises en considération lors de la comparaison entre les différentes statines (Maltese, 1990). La pravastatine, la simvastatine et l'atorvastatine lorsqu'utilisées à leurs doses standards, ne démontrent aucune différence significative dans leurs effets à long-terme sur la prévention des maladies cardiovasculaires (Zhou, 2006).

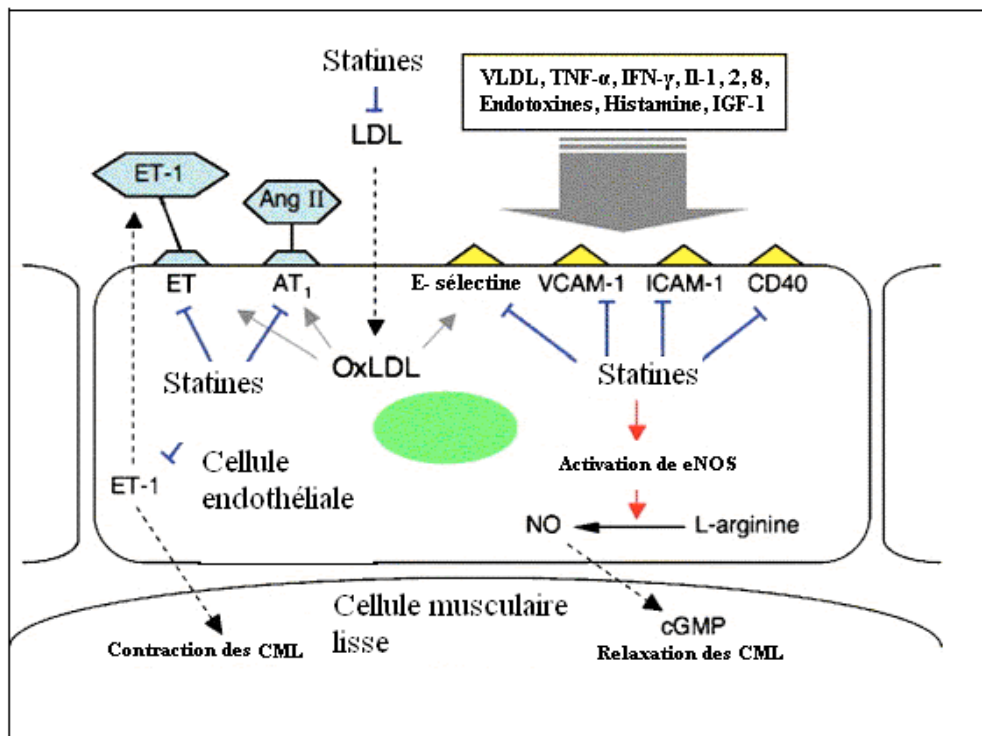


Figure 7: Cellules endothéliales activées par des LDL oxydés et par une variété de cytokines inflammatoires et les sites d'action des statines (Masaaki, 2007).

L'atorvastatine

La dysfonction endothéliale est associée à l'hyperlipidémie. L'atorvastatine a des propriétés pléiotropiques dont un effet protecteur sur la fonction endothéliale, mais permet aussi de diminuer les taux de lipides plasmatiques. Selon la littérature, l'atorvastatine améliore de façon significative la dilatation provoquée par le flot sanguin (FMD) après 1 à 6 semaines chez les patients qui présentaient déjà une dysfonction endothéliale. Lorsque le traitement est arrêté, l'effet sur la FMD disparaît en 36 heures (Taneva, 2006). Cette même étude démontre que 40 mg d'atorvastatine deux fois par jour sont bénéfiques chez les patients souffrant déjà d'une dysfonction endothéliale (Taneva, 2006).

Effet hypolipidémiant des statines

Au cours de la dernière décennie, des essais cliniques ont démontré qu'un traitement aux statines diminue les risques de dysfonctions coronariennes chez les patients avec ou sans problèmes cardiaques (Ong, 2006). La diminution de la concentration des lipides se fait par un mécanisme qui implique l'inhibition compétitive et réversible de l'enzyme HMG-CoA réductase, l'étape limitante dans la conversion du 3-hydroxy-3méthylglutaryl-coenzyme A au mévalonate, un précurseur du cholestérol (Almuti, 2006).

L'effet principal des statines résulte de leur capacité à abaisser les niveaux de LDL et d'augmenter les HDL. En effet, la combinaison de la baisse des LDL et de la hausse des HDL secondaire à la prise de statines diminue le contenu lipidique des plaques d'athérosclérose et affecte de façon favorable leurs effets biologiques. D'autres actions potentielles incluent l'augmentation de la synthèse de NO, de l'activité fibrinolytique, l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et du recrutement des monocytes et finalement une réduction des macrophages qui produisent des enzymes pour dégrader la matrice extracellulaire.

Les statines bloquent la synthèse hépatique du cholestérol en inhibant la conversion de l'HMG-CoA en acide mévalonique, précurseur du cholestérol, par l'intermédiaire de l'HMG-CoA réductase. Cette inhibition entraîne une augmentation compensatoire du nombre de récepteurs de lipoprotéines de basse densité (LDL au niveau hépatique surtout) qui jouent un rôle dans la séquestration des LDL du plasma et dans la réduction de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL. Ceci conduit à une réduction de la production des LDL. Les statines ont peu d'effet sur l'hypertriglycémie et augmentent peu les taux de lipoprotéines de haute densité (HDL); ils ont surtout pour effet d'abaisser les taux de LDL. L'atorvastatine fait chuter les taux élevés de triglycérides mieux que les autres statines. Les effets des statines sur les LDL et les HDL varient d'un agent à l'autre. Une thérapie intensive avec des statines à très hautes doses dans le but d'obtenir une diminution des lipides en général peut donner des résultats très significatifs

comparativement à une thérapie à dose standard utilisée dans la prévention des problèmes cardiovasculaires non fatals. Les statines ont aussi des effets bénéfiques dans la réduction des niveaux de LDL chez les patients ayant eu une transplantation cardiaque (Patel, 2002), mais des recherches plus poussées seraient nécessaires afin d'en déterminer le processus exact.

En plus de diminuer le taux des lipoprotéines de faible densité (LDL), les statines améliorent aussi la dysfonction endothéliale. Ces effets additionnels font partie des effets pléiotropiques des statines (Taneva, 2006) dont la diminution des risques d'accidents cérébrovasculaires, d'inflammation, de thrombose, de plaques athérosclérotiques, de néphropathies, de maladies du SNC, de maladies autoimmunes, de sepsis, de maladies gastro-intestinales, d'ostéoporose et de dégénérescence maculaire. Elles ont de plus des effets antioxydants et diminuent le taux de mortalité dû à des problèmes coronariens en général (Almuti, 2005). Les statines exercent donc des effets bénéfiques sur la microcirculation de façon indépendante de leurs effets sur la diminution des niveaux de cholestérol sérique (Scalia, 2002). Ils incluent l'inhibition de l'adhésion plaquettaire et de la thrombose, la diminution de l'inflammation vasculaire, l'augmentation de la stabilité des plaques et également, un effet bénéfique sur la fonction endothéliale basale ainsi qu'une prévention des dommages dûs à la reperfusion (Wolfrum, 2003).

Dans un autre ordre d'idée, le traitement aux statines est coûteux et la littérature reste controversée quant au moment le plus pertinent pour débiter ce traitement afin d'obtenir les meilleurs résultats. Le traitement aux statines ne devrait plus être considéré seulement pour l'hyperlipidémie, mais également pour prévenir et réduire les problèmes cardiovasculaires cliniques. Donc, les patients qui devraient bénéficier du traitement aux statines, sont ceux avec le plus de facteurs de risque tels : des LDL > 100mg/dl, les fumeurs, les diabétiques, les patients avec athérosclérose et cela indépendamment de leur niveau basal de lipides (Ong, 2006).

Selon une méta-analyse publiée dans le *BMC family practice* par Edwards en 2003, les statines seraient efficaces et bénéfiques dans la prévention primaire et secondaire des risques d'évènements cardiovasculaires. Des diminutions du cholestérol total de 25% ou plus et des LDL de plus de 30% ont été enregistrées à des doses fixes de simvastatine 40 mg, d'atorvastatine 10 mg, et de rosuvastatine 5 mg et 10 mg.

Une méta-analyse de Cannon a prouvé qu'une thérapie aux statines utilisant une dose élevée de lipitor (80mg) en vue d'obtenir une diminution importante de lipides dans l'organisme était plus efficace qu'une thérapie avec dose standard (10- 40mg). Les paramètres évalués durant l'étude étaient l'incidence combinée de décès dûs à des évènements coronariens ou d'infarctus du myocarde non fatals, l'incidence combinée de décès dûs à des évènements coronariens ou d'évènements cardiovasculaires (IM, ACV, angine, revascularisation), l'incidence d'accidents cérébraux-vasculaires et finalement l'incidence de mortalité cardiovasculaire, non-cardiovasculaire, et de toute cause. Cette méta-analyse a démontré qu'il y avait une diminution significative de l'incidence de ces évènements avec des doses plus élevées d'atorvastatine (Cannon, 2006).

Effets de statines sur la dysfonction endothéliale

Effet des statines sur la libération du NO

La dysfonction endothéliale résulte d'une production augmentée d'espèces oxygénées activées et d'une diminution de la biodisponibilité du NO. Les inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase (ie, statines) exercent des effets vasoprotecteurs indépendants du cholestérol qui résultent en partie de l'inhibition des petites protéines couplées aux protéines G, Rho et Rac. Rho contribue négativement à la synthèse du NO endothélial et Rac contribue à l'activation du NADPH oxydase et de la production des superoxydes. Les statines inhibent l'activité GTPase de Rho et Rac via l'inhibition de la géranyl-géranylation, qui augmente la synthèse de NO endothélial et diminue la production de superoxydes respectivement. Cet effet des statines n'est pas dépendant de la

baisse du cholestérol et pourrait être dû à l'inhibition de Rho qui entraînerait une augmentation de l'expression de la eNOS.

Les effets vasculaires des statines indépendants de la baisse du CH sont la restauration directe et l'amélioration de la dysfonction endothéliale par l'augmentation de la production de NO, par la ré-endothélialisation après un événement coronarien et par l'inhibition des réponses inflammatoires dans la paroi vasculaire. Ces effets directs sont tous liés à leurs propriétés à la promotion de la production du NO en régulant à la hausse la eNOS (Kureishi, 2000). De plus, la voie de signalisation PI_3 kinase/Akt, régulatrice du métabolisme cellulaire et de l'apoptose est responsable de la régulation à la hausse de la eNOS induite par les statines dans les cellules endothéliales.

D'autres études ont rapportées sur le rôle des statines dans le traitement de la dysfonction endothéliale. Cette protection de l'endothélium est possible grâce à l'effet antioxydant et anti-inflammatoire des statines et leur capacité à restaurer la biodisponibilité du NO. Les statines régulent à la hausse la libération de la eNOS en prolongeant la demi-vie de la eNOS mARN, mais non la transcription du gène de la eNOS (Bonetti, 2003). L'hypoxie, les LDL oxydés, les cytokines, tels $TNF-\alpha$, diminuent l'expression de la eNOS en réduisant la stabilité de la eNOS mARN, les statines prolongent la demi-vie de la eNOS et contrecarrent ces conditions néfastes (Wolfrum, 2003). Kureishi et al ont aussi démontré que les statines activent la protéine kinase Akt (Kureishi, 2000). La sérine-thréonine kinase Akt est un régulateur important de plusieurs processus cellulaires, incluant des métabolismes cellulaires et l'apoptose. L'activation d'un récepteur tyrosine kinase couplé à une protéine G mène à l'activation de phosphatidylinositol 3 kinases ($PI3k$), les produits qui provoquent la phosphorylation et l'activation d'Akt (Kureishi, 2000). Akt module donc plusieurs cibles, dont la caspase-9 et le eNOS par phosphorylation (Cardone, 1998). Conséquemment, l'activation d'Akt par les statines inhibe l'apoptose des cellules endothéliales et augmente la production du NO (Kureishi, 2000). Les activités pléiotropiques rapportées des statines sont liées aux réductions des niveaux d'isoprénoides qui augmentent la biodisponibilité du NO des cellules

endothéliales. Compte tenu du rôle essentiel du NO dans la préservation des structures et des fonctions vasculaires, l'effet des statines est d'une importance thérapeutique primordiale. Les statines restaurent donc la production de NO par les cellules endothéliales par plusieurs mécanismes incluant la régulation à la hausse de l'expression de la protéine NO synthase et par la diminution de la formation des espèces oxygénées activées (Mason, 2004). La thérapie avec les statines augmente aussi la production du NO et inhibe la prolifération des CML favorisant la relaxation dépendante de l'endothélium (Takemoto, 2001). Landmesser a démontré en 2004 qu'une augmentation de la disponibilité de la eNOS induite par les statines était requise pour l'amélioration de la mobilisation cellulaire des cellules progénitrices endothéliales, de la néovascularisation myocardique, de la dysfonction du ventricule gauche, de la fibrose interstitielle et de la chance de survie post-infarctus du myocarde. La biodisponibilité de la eNOS après un infarctus du myocarde représente une importante cible thérapeutique dans l'insuffisance cardiaque post-infarctus (Landmesser, 2004). Une étude de Jensen en 2004 a démontré qu'un traitement à la simvastatine 40mg/d pour 1 an était plus efficace que celui de 3 mois afin de restorer la dilatation dépendante de l'endothélium chez des patients avec hypercholestérolémie (Jensen, 2004).

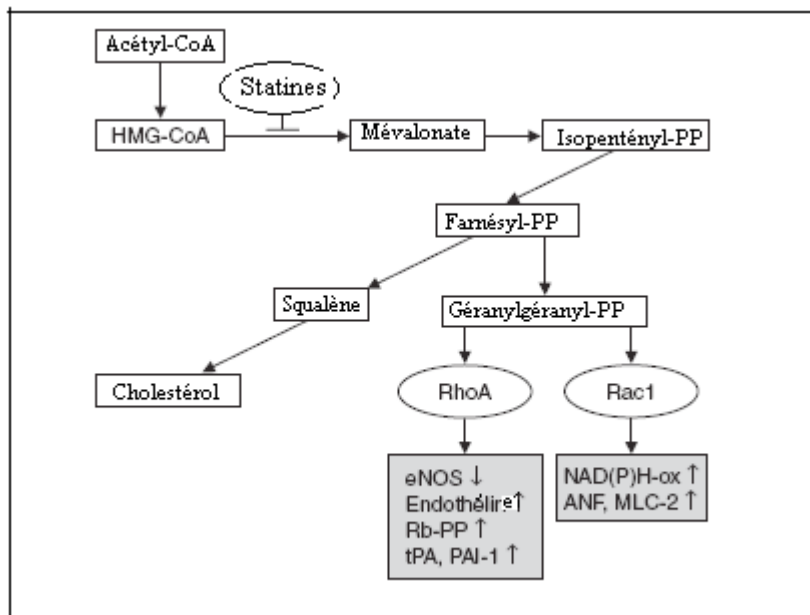


Figure 8: Schéma de la voie de mévalonate et effet des statines sur l'expression de la eNOS et sur l'inhibition du NADPH oxydase (Endres, 2004).

Les effets des statines sur l'endothéline

Les statines réduisent les niveaux du peptide endothéline –1, un vasoconstricteur puissant qui joue un rôle essentiel dans la régulation du tonus vasculaire et de la prolifération cellulaire (Flowers, 1995). Les statines réduisent la synthèse d'ET-1 et l'expression de mRNA de son précurseur, la préproET-1. La géranyl-géranlylation et non la farnésylation est essentielle pour l'expression basale du gène préproET-1. La Rho GTPase règle l'expression du gène préproET-1 et donc les statines inhibent l'activation Rho-dépendante de la transcription du gène préproET-1 empêchant son effet vasoconstricteur sur l'endothélium (Flowers, 1995).

Effet antioxydant des statines

Les statines inhibent l'isoprénnylation des protéines clés impliquées dans le processus oxydant/antioxydant favorisant ainsi son effet anti-inflammatoire. Takemoto a suggéré l'utilisation des statines comme thérapie antioxydante pour la prévention de l'hypertrophie des cardiomyocytes. En effet, l'hypertrophie cardiaque est une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde. Les petites

protéines G de la famille des Rho sont en partie responsables du processus de développement de l'hypertrophie cardiaque. Une thérapie aux statines diminue les niveaux systémiques de protéines liées à la nitrotyrosine (NO₂Tyr), un marqueur de stress oxydant activé via les voies qui impliquent des EOA dérivées du NO (Shishebor, 2003). Ces voies participent à la conversion oxydante des LDL en particules athérogéniques, à l'initiation de la peroxydation des lipides, de la consommation du NO menant à la dysfonction endothéliale, et l'activation des métalloprotéinases de la matrice et des cascades alternatives de protéases (Sugiyama, 2001).

Les traitements actuels de l'hypertrophie cardiaque sont limités aux vasodilatateurs ou aux agents réducteurs de post-charge, avec peu de thérapies concentrées sur le processus myocardique si l'on exclut les inhibiteurs de l'ACE qui peuvent influencer l'HVG.

Les statines sont beaucoup prescrites afin d'abaisser le niveau de cholestérol chez certains patients pour diminuer l'incidence d'infarctus du myocarde et d'accidents cérébraux vasculaires (Shepherd, 1995). En plus de diminuer les niveaux de cholestérol, les statines inhibent aussi la synthèse d'intermédiaires des isopranoïdes qui sont importants dans l'attachement des lipides à la localisation sous-cellulaire et la fonction d'une variété de protéines, incluant la protéine Rho (Goldstein, 1990).

Effet antioxydant des statines et répercussion sur l'hypertrophie ventriculaire gauche

L'hypertrophie cardiaque représente une réponse physiologique adaptative initiale à une augmentation de la pression sanguine ou à une post-charge. Toutefois, malgré une normalisation de la pression sanguine par la médication, l'hypertrophie cardiaque progresse fréquemment vers l'insuffisance cardiaque (Vasan, 1996). En effet, l'hypertrophie cardiaque est un facteur de risque indépendant dans les maladies cardiovasculaires, et augmente la mortalité reliée à un événement cardiovasculaire par un facteur de deux (Chien, 1991). Le processus hypertrophique est caractérisé par l'induction de gènes immédiats tels c-fos, c-jun et erg-1 au

niveau des cardiomyocytes, mais aussi par la ré-expression de gènes embryonnaires tels ANF, β -les chaînes lourdes de la myosine, d' α -actine squelettique et l'augmentation de la synthèse des protéines contractiles telles les chaînes légères de la myosine-2 (MLC-2v) et d' α -actine cardiaque (Lembo, 1995).

La stimulation du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (Ang II) ou une exposition à des pressions de mise en charge induisent une réponse cardiaque hypertrophique secondaire en partie par l'activation des protéines G hétéromériques (e.g G_q) (Mende, 1998), et des petites protéines G (e.g Ras et Rho) (Aoki, 1998). Les protéines Rho, RhoA, Rac1 et CDC₄₂ ont un rôle critique dans le développement de l'hypertrophie par leur régulation de la morphologie cellulaire et des éléments contractiles (Van Aelst, 2002). L'effet antioxydant des statines par la diminution des radicaux libres produits via l'ANG II dans les cellules musculaires lisses par l'inhibition de l'activité NADPH oxydase impliquant Rac et par la régulation à la baisse de l'expression des récepteurs de l'AT-1 de l'angiotensine freine le processus hypertrophique (Wassmann, 2002).

En plus d'inhiber la synthèse du cholestérol, les statines inhibent aussi la synthèse d'un intermédiaire de l'isopranoïde qui est très important au niveau de la liaison des lipides requis lors de la localisation intracellulaire et la fonction de nombreuses protéines, incluant la protéine Rho (Goldstein, 1990).

Une étude de Takemoto et al en 2001 visait à démontrer que les statines atténuaient l'hypertrophie cardiaque en inhibant les protéines Rho. Les statines préviennent en effet le développement de l'hypertrophie cardiaque d'une manière indépendante du cholestérol. Le mécanisme impliqué est l'inhibition de la synthèse de l'isopranoïde géranyl-géranyl qui active Rho, et de Rac1, qui lorsqu'activé, augmente la production d' O_2^- dans les myocytes cardiaques. Ils ont démontré aussi que l'antioxydant non spécifique, N-acétylcystéine, était aussi efficace que les statines pour inhiber l'ANG II qui induit l'hypertrophie cardiaque. Cependant, d'autres travaux doivent déterminer le mécanisme précis de l'effet antioxydant de N-acétylcystéine. Les statines et les antioxydants ont donc des effets inhibiteurs sur l'hypertrophie cardiaque, le mécanisme exact reste encore inconnu cependant. Une

étude de Senthil en 2005 a démontré que l'on peut prévenir la progression de l'hypertrophie cardiaque dans un modèle de lapins transgéniques knockout de la chaîne lourde de β -myosine avec une dose de 2,5 mg/kg/jour d'atorvastatine sur une période allant jusqu'à 1 an. Le taux de cholestérol total réduit de 49% après l'administration d'atorvastatine. La masse ventriculaire gauche, l'épaisseur pariétale, la taille des cardiomyocytes, les niveaux de marqueurs moléculaires de l'hypertrophie, la peroxydation des lipides et l'ADN mitochondriale oxydée étaient tous augmentés significativement dans le groupe placebo contrairement au groupe traité à l'atorvastatine (Senthil, 2005).

Effet anti-inflammatoire des statines

Les statines possèdent une action anti-inflammatoire en réduisant le nombre de cellules inflammatoires dans les plaques athérosclérotiques. L'athérosclérose est un processus inflammatoire complexe caractérisé par la présence de monocytes, macrophages, de lymphocytes T et de cytokines inflammatoires qui peuvent modifier la fonction endothéliale. Les statines inhibent l'interaction des leucocytes à l'endothélium en favorisant la libération du NO, une action anti-inflammatoire cruciale qui atténue l'infiltration des leucocytes tels les neutrophiles dans les régions inflammées (Kimura, 1997; Romano, 2000). De plus, les statines diminuent l'adhésion des molécules d'adhésion endothéliale (ex. la P-sélectine soluble et les molécules d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et des cytokines telles les interleukines 6 et 8 qui sont impliquées dans le recrutement des cellules inflammatoires dans les cellules endothéliales (Romano, 2000). Aussi, les statines peuvent diminuer l'expression des molécules pro-inflammatoires induites par le CD₄₀ ligand et par ses voies de signalisation. Un autre mécanisme de la réduction de l'inflammation est la réduction des niveaux de protéines C-réactives qui est un réactant de phase aigu produit par le foie en réponse à l'augmentation des cytokines inflammatoires et qui affecte la fonction endothéliale normale en diminuant l'expression de la eNOS endothéliale (Venugopal, 2002). Aussi, les statines peuvent préserver la fonction endothéliale en protégeant l'endothélium contre des insultes impliquant le complément en surexprimant le facteur accélérateur de dissociation

(DAF). DAF est une protéine plasmatique membranaire qui est largement distribué dans les cellules sanguines et dans les cellules endothéliales et agit en inhibant la cascade de complément à une étape critique de C3 convertase. DAF joue donc un rôle protecteur contre les maladies auto-immunes et contre les processus inflammatoires (Mason, 2002).

Effet antithrombotique des statines

Les événements thrombotiques sont reliés à la diminution de la thrombomoduline et à une régulation à la hausse du facteur tissulaire à la surface de l'endothélium, favorisant ainsi les thrombus. Les statines augmentent l'expression de la thrombomoduline à la surface cellulaire et diminuent de façon indirecte l'expression du facteur tissulaire et l'activité intracellulaire des cellules endothéliales en inhibant la voie Rho-kinase dépendante (Eto, 2002). De plus, les statines réduisent les niveaux de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène et du facteur antifibrinolytique de type 1 (tPAI-1) qui résulte en une activité fibrinolytique augmentée (Bourcier, 2000). Les statines réduisent aussi les niveaux de facteurs von Willebrand impliqués dans les processus procoagulants (Bickel, 2002). Aussi, il est démontré que les statines peuvent diminuer l'activité protéolytique en inhibant la métalloprotéinase-9 (Ercan, 2004).

Effet des statines sur l'angiogénèse

Une modulation de l'angiogénèse par les statines a récemment été démontrée. À des concentrations micromolaires, l'atorvastatine diminue la production de l'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire et pro-angiogénique et inhibe aussi la synthèse de l'activateur de plasminogène urokinase, un médiateur inflammatoire important. De plus, elle diminue l'effet de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) et de la thrombospondine-1 (TSP-1), un inhibiteur de l'angiogénèse. L'atorvastatine stimule aussi l'expression de l'angiopoïétine et stimule donc la production de la eNOS (Dulak, 2005).

Dulak a étudié les effets de l'atorvastatine sur les cellules endothéliales des cordons ombilicaux chez l'humain et démontre que l'effet proangiogénique de

l'atorvastatine à des concentrations nanomolaires n'est pas dépendant de la prolifération cellulaire puisque les concentrations de VEGF n'étaient pas augmentées lors de l'administration de l'atorvastatine. La eNOS et le HO-1 participent à l'angiogenèse et à la protection des cellules endothéliales contre l'apoptose et le stress oxydant. L'atorvastatine favorise une augmentation de l'expression du NO, mais aucun résultat n'a été significatif pour le HO-1 (Dulak, 2005).

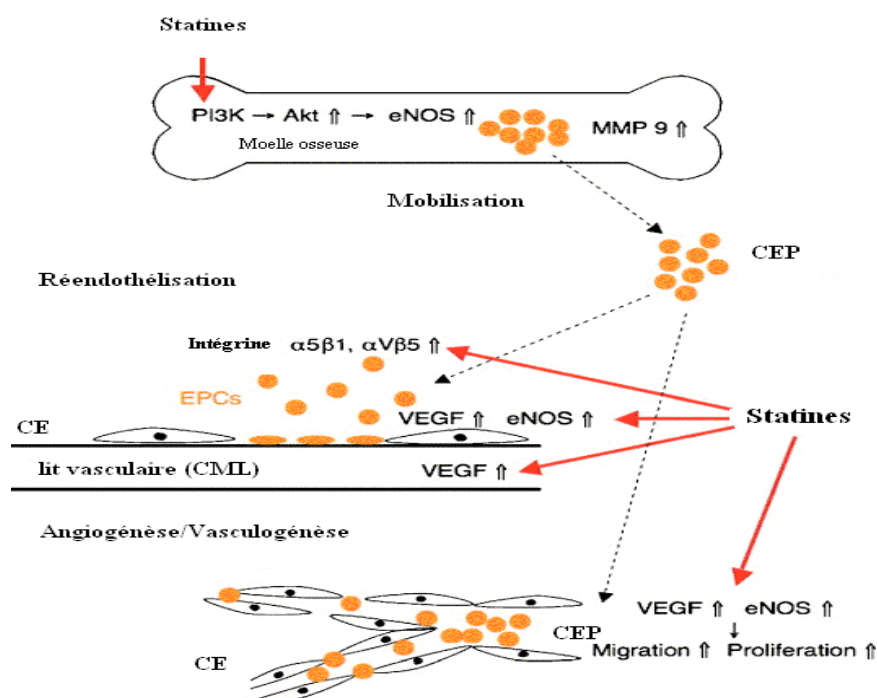


Figure 9 : Mobilisation des cellules endothéliales progénitrices de la moelle et contribution à l'angiogenèse et à la réendothélialisation (Masaaki, 2007).

Effet de la eNOs sur la densité des capillaires myocardiques en présence d'atorvastatine

Des études récentes ont suggéré que l'inhibition de la production du NO dérivé de l'endothélium peut endommager la néovascularisation myocardique et que les statines ont un effet pro-angiogénique (Matsunaga, 2002). Ce phénomène s'appelle la néogenèse et est une voie thérapeutique surtout lors des lésions d'ischémie - reperfusion. Ce phénomène implique aussi la voie Akt (Dimmeler, 2001). Les

statines augmentent non seulement le nombre de cellules endothéliales circulantes, mais induisent aussi leur différenciation en cellules progénitrices. Cependant, des résultats à l'opposé des ceux-ci ont été publiés par l'équipe de Sellker. En effet, des études in vitro démontrent que les effets pro-angiogéniques des statines sont liés à l'activation d'Akt, un médiateur de la survie des cellules endothéliales et un activateur de la synthèse de NO. L'atorvastatine est associée avec une diminution des facteurs de croissance qui contribue à la relaxation des microvaisseaux et à une diminution significative de la perfusion par les collatérales. Une activation chronique d'Akt augmente l'expression myocardique d'endostatine et diminue l'activation des facteurs de croissance ce qui résulte en une réponse angiogénique endogène diminuée (Boodhwani, 2008). Il semblerait que l'effet anti-angiogénique soit relié à la dose. Par exemple, ils ont démontré que l'atorvastatine à haute dose était reliée à ces effets dans des modèles de porcs hypercholestérolémiques et normocholestérolémiques (Boodhwani, 2006, 2008)

CHAPITRE SEPTIÈME

APPLICATIONS CLINIQUES DES STATINES

L'athérosclérose (ASO)

Plusieurs métalloprotéinases matricielles (MMP) sont sécrétées dans une forme inactive latente ayant besoin d'être activées afin de cliver leur substrat par les cellules musculaires lisses. Ces MMPs causent une destruction de la matrice extracellulaire et induisent une instabilité des plaques athérosclérotiques. Une étude de Luan a démontré que les statines inhibaient la sécrétion de plusieurs MMPs par les cellules musculaires lisses et macrophages contribuant ainsi à l'effet de stabilisation des plaques (Luan, 2003).

Le remodelage artériel aux points de bifurcation des artères coronaires de patients souffrants d'athérosclérose a été évalué par un traitement à l'atorvastatine 80 mg/jour en comparaison avec un traitement à la pravastatine 40mg/jour. Le traitement à plus forte dose était associé à une augmentation de la lumière du vaisseau et à une plus grande élasticité du vaisseau aux points de bifurcations. Un traitement intensif dans le but de réduire les lipides peut engendrer un effet significatif aux régions prédisposées au développement de plaques d'athérome et au remodelage en réponse aux changements dans les plaques (Nicholls, 2005).

L'insuffisance cardiaque (IC)

L'insuffisance cardiaque est la manifestation ultime la plus sévère de toutes les formes de maladies cardiovasculaires résultant de l'athérosclérose coronarienne, d'infarctus du myocarde, des maladies valvulaires, de l'hypertension, de défauts cardiaques congénitaux et des cardiomyopathies. Plus de 400 000 nouveaux cas d'insuffisance cardiaque sont diagnostiqués chaque année aux États-Unis. L'insuffisance cardiaque résulte principalement d'une fonction altérée du ventricule gauche. Cette condition résulte d'une anomalie des structures cardiaques ou de leur fonction qui sont responsables de l'incapacité du cœur à se remplir ou à éjecter du sang de façon suffisante à subvenir aux besoins des tissus et des organes. L'insuffisance cardiaque est associée à une réponse neurohumorale et hormonale caractérisée par une augmentation de la concentration d'agents vasoconstricteurs, tels que l'ANG II, l'ET-1 et la vasopressine, ainsi que par une augmentation de

l'activité du système nerveux sympathique. Il en résulte une augmentation de la résistance périphérique vasculaire et de la post-charge (Schiffrin, 1994). De plus, un facteur contractant dépendant de la COX est impliqué dans l'augmentation de la vasoconstriction dans l'IC, puisqu'une inhibition de cette enzyme par l'indométhacine augmente la vasorelaxation en réponse à l'ACh chez les humains. Une composante également importante de l'IC est une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium par la voie de la eNOS (Smith, 1996).

L'insuffisance cardiaque est associée au stress oxydant et à la déplétion du glutathion tripeptidique, qui assure le maintien du statut rédox cellulaire (Hill, 1997).

Un traitement à faible dose d'atorvastatine (10 mg/jour) améliore la fonction endothéliale et réduit l'expression de cytokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque (Tousoulis, 2005). L'administration combinée d'une petite dose d'atorvastatine et de vitamine E bloque le processus inflammatoire activé par des cytokines et molécules d'adhésions impliquées dans l'insuffisance cardiaque diminuant ainsi les niveaux d'espèces oxygénées activées et prévenant le développement de l'hypertrophie pathologique (Tousoulis, 2005).

Cependant, les effets des statines sur l'inflammation systémique dans l'insuffisance cardiaque ne sont pas très bien définis jusqu'à présent (Mozaffarian, 2005). Une étude du même auteur évalue des effets de l'atorvastatine (10 mg/d pendant 4 mois) sur l'inflammation systémique dans l'insuffisance cardiaque a démontré une diminution de certains marqueurs tels TNF - R1, CRP, ET-1, mais pas sur d'autres tels IL-6 et BNF (Mozaffarian, 2005).

L'hypertension artérielle (HTA)

Dans des modèles expérimentaux de différentes formes d'hypertension, la capacité vasodilatatrice de l'endothélium est réduite (Vanhoutte, 1989, Vanhoutte et Boulanger, 1995). Des preuves probantes chez les animaux et chez les humains indiquent que la dilatation normalement induite par l'ACh est altérée chez les personnes souffrant d'hypertension (Vallance, 2001). La synthèse basale de monoxyde d'azote est réduite chez les patients hypertendus et que la réponse vasoconstrictrice au L-NMMA est réduite dans les hypertensions non traitées (Vallance, 2001). L'hypertension est caractérisée par une atteinte de la fonction endothéliale et de la relaxation ainsi que par une augmentation de la réponse des CML aux facteurs contractants dérivés de l'endothélium (Schiffrin, 1992). Le modèle de rat spontanément hypertendu (SHR) est le plus couramment utilisé pour tenter d'expliquer les mécanismes impliqués dans l'hypertension essentielle, grâce à sa correspondance à la situation clinique. Une hausse du stress oxydant est impliquée dans la grande majorité des études expérimentales à l'exception du modèle d'hypertension induite par la noradrénaline (Laursen, 1997). Les relaxations dépendantes de l'endothélium chez les patients souffrants d'hypertension essentielle peuvent également être modulées par la présence simultanée d'autres facteurs de risque, tel l'hyperhomocystéinémie. Une diminution de la biodisponibilité du NO et des relaxations dépendantes de l'endothélium induite par l'augmentation des niveaux plasmatiques d'homocystéine exacerbe le niveau du stress oxydant (Virdis, 2001). Il existe une forte corrélation entre l'hypertension et les risques d'athérosclérose. Un traitement pharmacologique contre l'hypertension réduit les risques d'insuffisance cardiaque. Des études plus récentes ont aussi démontré que la thérapie anti-hypertensive favorise une réduction des risques de maladies coronariennes, particulièrement de celles modulant le système rénine-angiotensine (Harrison, 2005). Une étude de Mohamed en 2005 a démontré un effet bénéfique d'un traitement à la simvastatine et du losartan sur la diminution de l'hypertension artérielle. Ces médicaments réduisent le stress oxydant et améliorent la dysfonction endothéliale. Une étude de la variante du gène de la eNOS sur les modulations de la tension artérielle en lien avec des niveaux de cholestérol sérique chez l'humain a

démontré un effet direct des lipides sur la pression artérielle. Une variante du gène de la eNOS Glu298Asp dans la modulation de la tension artérielle est en lien avec les niveaux de lipides. (Pereira, 2006).

La fibrillation auriculaire (FA)

La fibrillation auriculaire peut survenir en conséquence à des changements structuraux causés par l'inflammation. Il y a une élévation de la protéine C réactive (CRP) chez des patients avec fibrillation auriculaire (Chung, 2001). Les statines diminuent les risques d'évènements cardiovasculaires en réduisant l'inflammation du réseau artériel, phénomène démontré par une réduction de la CRP dans le sérum. Cette réduction semble être indépendante de la diminution des niveaux de LDL (Jialal, 2001). L'atorvastatine diminue le taux de récurrence de fibrillation auriculaire après cardioversion électrique chez les humains par ses propriétés anti-inflammatoires (Ozaydin, 2006). La fibrillation auriculaire est une complication fréquente après une chirurgie cardiaque. L'équipe de chercheurs de Marín ont évalué l'effet des statines sur la diminution de l'incidence de la fibrillation auriculaire après pontages aorto-coronariens. De plus, ils ont émis l'hypothèse que la régénération de la matrice extracellulaire et du BNP peut être reliée à un remodelage de l'oreillette et est impliqué dans le développement de la fibrillation auriculaire post-opératoire. Les statines pourraient avoir un effet protecteur contre la fibrillation auriculaire après pontages, possiblement en diminuant les altérations de la matrice extracellulaire et du remodelage.

Le diabète

Il existe une controverse concernant la dysfonction endothéliale chez les patients avec un diabète de type 1. La fonction endothéliale peut être modulée par divers facteurs associés au diabète dont le niveau d'hyperglycémie, l'accumulation des produits finaux de la glycolyse, les concentrations d'insuline, les complications secondaires. La variation de ces facteurs entre les études peut expliquer leurs résultats conflictuels. Par contre, plusieurs résultats indiquent que la relâche du monoxyde d'azote est altérée dans le diabète de type 1 (Hink, 2003). Ce déficit en

NO s'explique en premier lieu par sa neutralisation par l' O_2^- augmenté dans le diabète. Cet anion est dérivé de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que de l'activation de la NADPH oxydase suite à une stimulation par l'hyperglycémie et par l'augmentation des acides gras circulants, deux épiphénomènes du diabète (Evans, 2002). L'interaction entre le NO et l' O_2^- produit la formation vasculaire de $ONOO^-$ qui oxyde la BH_4 en une biptérine inactive pour stimuler la eNOS, entraînant un découplage fonctionnel de l'enzyme (Hink, 2001). Ceci résulte en une diminution de la production de NO et conséquemment des relaxations dépendantes de l'endothélium. D'autres travaux ont démontré une réponse diminuée des récepteurs muscariniques chez les patients ayant un diabète de type 2. Ces observations suggèrent que la dysfonction endothéliale précède probablement le diabète de type 2 (Vallance, 2006).

Il y a une augmentation de l'incidence de maladies coronariennes chez les personnes souffrant de diabète insulino et non-insulino dépendant. Le diabète est un facteur de risque indépendant pour les maladies coronariennes dont l'incidence est liée à la durée du diabète. Ainsi les diabétiques ont un risque plus élevé d'infarctus du myocarde et fréquemment ces patients ne ressentent aucune douleur transthoracique ou démontrent une présentation atypique. Ces patients présentent également des cardiomyopathies restrictives en l'absence de maladie des artères coronaires épicaudiques, avec une relaxation anormale du myocarde et une pression ventriculaire de remplissage élevée. Le traitement à l'insuline peut améliorer la dysfonction myocardique. Les statines ont un effet bénéfique sur le diabète de type 2 en favorisant une diminution des niveaux de LDL (Sorof, 2006). De plus, des études ont démontré qu'un traitement aux statines chez les diabétiques favorisait le développement de vaisseaux collatéraux comme mécanisme compensatoire des sténoses des artères coronariennes (Sorof, 2006).

Les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) et le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (ARDS)

Dans une étude de Mancini en 2006, les statines, les inhibiteurs de conversion de l'angiotensine ainsi que les bloqueurs de récepteurs de l'angiotensine réduisaient la morbidité et la mortalité chez les patients avec MPOC (Mancini, 2006). Cependant, ces résultats devront être confirmés par des essais cliniques randomisés. Les statines peuvent être utilisées à cause de leurs propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatoires (Fedson, 2006).

Les maladies neurodégénératives

Par leur action inhibitrice de la hydroxy-méthylglutaryl-coenzyme A réductase, les statines pourraient avoir un effet bénéfique sur les désordres neurodégénératifs en induisant la différenciation et la mort cellulaire des neurones cérébraux (astrocytes et cellules gliales) (Marz, 2007).

Les événements cérébrovasculaires et la revascularisation

Les statines ont des effets bénéfiques sur la revascularisation cérébrale par leurs propriétés anti-inflammatoires et sur les événements cardiovasculaires par leurs propriétés anti-thrombotiques. Les statines utilisées quotidiennement chez les patients avec syndrome coronarien aigu peuvent améliorer la fonction endothéliale, mais peuvent avoir des effets biphasiques et dépendants des concentrations sur l'angiogenèse. Des études in vitro démontrent que les effets proangiogéniques des statines sont liés à l'activation d'Akt, un médiateur de la survie des cellules endothéliales et un activateur de la synthèse de NO. L'atorvastatine est associée avec une diminution des facteurs de croissance qui contribue à la relaxation des microvaisseaux et à une diminution significative de la perfusion par les collatérales. Une activation chronique d'Akt augmente l'expression myocardique d'endostatine et diminue l'activation des facteurs de croissance ce qui résulte en une réponse angiogénique endogène diminuée (Boodhwani, 2008).

Le cancer

Le cancer pourrait être une nouvelle indication pour l'utilisation des statines. Un mécanisme plausible pour expliquer l'inhibition de la tumeur est que les statines inhibent l'isoprénnylation de Rho et Ras, de petites protéines G qui régulent la prolifération cellulaire. En effet, on retrouve chez 30% des cancers une mutation de Ras qui participe à la différenciation aberrante des cellules (Forrester, 2007).

La chirurgie cardiaque

Les chirurgies cardiaques comportent des risques de mortalité précoce de 2-3% dûs aux infarctus du myocarde péri-opératoire, au bas débit cardiaque et aux arythmies. Les statines atténuent la thrombogénèse, normalisent la dysfonction endothéliale, mitigent le stress oxydant et les dommages dûs à la reperfusion. Un groupe de cardiologues de l'université de Dalhousie a voulu évaluer sur leurs patients l'impact de la prise de statines en pré-opératoire sur la diminution du taux de mortalité en milieu hospitalier. Les statines n'ont eu aucun effet sur la mortalité péri-opératoire et ne semblait pas limiter l'inflammation microvasculaire, les dommages dûs à la reperfusion, les risques de thromboses et ne semblait pas améliorer la dysfonction endothéliale (Ali, 2004). Dans un article publié en 2008 par Paraskevas, les statines amélioraient la perméabilité des pontages aorto-coronariens et le taux de mortalité à long terme. De plus, celles-ci peuvent diminuer le nombre de complications post-opératoire et le nombre de jours d'hospitalisation chez ces patients. Les statines diminuent donc le risque d'angine, d'IM, d'arythmies, d'ACV et de mortalité post-opératoire contrairement à ce qu'Ali a publié en 2004. Les mécanismes impliqués dans la diminution de ces complications seraient la diminution de l'inflammation et du stress oxydant, l'amélioration de la fonction endothéliale et l'amélioration du profile lipidique post-opératoire (Merla R, 2007). Les statines préviendraient aussi la fibrillation auriculaire de novo et les insuffisances rénales associées aux pontages. Lors de transplantations cardiaques, les statines diminuent les vasculopathies cardiaques d'allogreffes et le taux de rejet. Le mécanisme impliqué serait par l'inhibition de l'IL-1 (Paraskevas, 2008) Une diminution significative du taux de mortalité post transplantation cardiaque est aussi observée. Selon les

résultats observés dans une méta-analyse, les statines contribuent à une vie sauvée pour 8,5 récipiendaires d'un cœur transplanté par année. Aussi, un traitement de routine aux statines chez des transplantés cardiaques peut prolonger 471 vies par année parmi 4000 cœurs transplantés dans le monde entier. Finalement, d'autres études démontrent un rôle bénéfique des statines chez des patients ayant subi une réparation de valves cardiaques (par la diminution du taux de progression de la sténose secondaire à la calcification de la valve), chez les transplantés pulmonaires et ceux ayant eu une lobectomie et également chez ceux ayant eu une résection d'anévrysme de l'aorte thoracique (Paraskevas, 2008).

Hypothèses et Buts

Les statines ont prouvé leur efficacité, sécurité et tolérance depuis plus d'une quinzaine d'années chez un grand nombre de patients. Il est démontré que les statines sont un traitement de premier choix dans la baisse des niveaux de lipides.

Par contre, les effets pléiotropiques des statines sont indépendants de la baisse de cholestérol. Ils incluent l'inhibition d'EOA, de l'expression des molécules d'adhésion leucocytaires, des facteurs de croissance qui induisent la synthèse d'acide désoxyribonucléique, la production de macrophage, l'activation des lymphocytes T, l'expression des cytokines inflammatoires incluant TNF- α , des interleukines, le ligand CD₄₀, des facteurs de croissance et de chimiokines, et de la régulation à la hausse de la synthèse de NO (Rosenson, 2001).

Au cours des 13 dernières années, nous avons documenté et développé un modèle d'HVG secondaire à un cerclage aortique d'une durée de deux mois chez le porc qui développe une dysfonction endothéliale présente au niveau des artères coronaires épicaudiques, associée avec une diminution de la biodisponibilité du NO pour les CML (Malo, 2003). De plus, un stress oxydant vasculaire significatif a été documenté par une augmentation des concentrations circulantes d'espèces oxygénées activées (Malo, 2003). Ces observations démontrent qu'il y a une diminution de l'activité antioxydante endogène et/ou une augmentation des niveaux d'EOA ainsi qu'une diminution de la biodisponibilité du NO soit par la diminution de sa synthèse ou par l'augmentation de sa destruction.

L'hypothèse de ce travail est que l'atorvastatine, par ses effets pléiotropiques, pourrait améliorer ou même renverser le processus de dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques associée à l'HVG dans un modèle porcin. De plus, nous voulions aussi évaluer, par des études échocardiographiques, si un traitement aux statines pouvait limiter le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Groupes expérimentaux

Quarante-deux porcs Landrace de 8 semaines (Primiporc Inc, Saint-Gabriel de Brandon, Qc, Canada), ont été aléatoirement divisés en 7 groupes expérimentaux. Les animaux du groupe témoin ont eu une thoracotomie sans cerclage de l'aorte ascendante (n=6). Le groupe contrôle avec cerclage aortique, mais non traité est le second groupe (n=6). Le troisième groupe a été traité avec l'atorvastatine (40 mg po die) du jour 1 post cerclage pour 60 jours (n=6) et le quatrième groupe a été traité avec l'atorvastatine (80 mg po die) du jour 1 post cerclage pour 60 jours (n=6). Le cinquième groupe est un groupe contrôle non traité avec cerclage aortique pour 90 jours (n=6). Le sixième groupe a été traité avec atorvastatine (80 mg po die) du jour 60 post cerclage aortique pour 30 jours (n=6). Finalement, le septième groupe est un groupe sans cerclage aortique, mais traité 60 jours avec atorvastatine (80 mg po die) (n=6) (Tableau I). Les porcs Landrace ont été entretenus et testés en accord avec les recommandations et directives sur les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire issus par le « Conseil Canadien sur les Animaux de Recherche », et aussi le « Comité Interne pour les Soins des Animaux » ont révisé et approuvé ce protocole.

Groupes Expérimentaux				
	Cerclage Aortique (O/N)	Traitement (O/N)	Début du traitement	Durée du traitement (jours)
Groupe 1	N	N, témoin	-	-
Groupe 2	O	N, contrôle 60 jours	-	-
Groupe 3	O	40 mg atorvastatine	Jour 1 post-cerclage	60
Groupe 4	O	80 mg atorvastatine	Jour 1 post-cerclage	60
Groupe 5	O	N, contrôle 90 jours	-	-
Groupe 6	O	80 mg atorvastatine	Jour 60 post-cerclage	30
Groupe 7	N	80 mg atorvastatine	-	60

Tableau I. Descriptions des groupes expérimentaux et de la durée de leur traitement. O: oui, N: non.

Procédure chirurgicale

Les porcs ont été anesthésiés par une injection intramusculaire d'un mélange de kétamine (20 mg/kg; Rogarsetic, Toronto, ON) et de xylazine (2mg/kg; Rompun, Cambridge, ON). Un ventilateur avec un mélange d'air/oxygène a été aussi utilisé pendant la chirurgie afin de maintenir un taux de saturation artérielle d'au moins 95% et de l'isoflurane 1% v/v (Abbott Laboratories, Montreal, Ca) a été administré comme agent anesthésique. La saturation artérielle et les niveaux d'acidose du sang ont été contrôlés par des gaz artériels faits fréquemment et si nécessaire, rééquilibrés avec 8,4% de bicarbonate de sodium (Abbott Laboratories, St-Laurent, QC). Un cathéter est placé dans une veine auriculaire pour l'administration d'antibiotiques au début de la chirurgie (Excenel 0,06 ml/kg; Pharmacia & Upjohn, Orangeville, ON). La cannulation veineuse se fait par la veine fémorale droite pour l'analyse de la pression sanguine et une sonde rectale est utilisée pour mesurer la température corporelle.

Une thoracotomie gauche dans le troisième espace intercostal avec approche antérieure est effectuée afin d'atteindre l'aorte ascendante où un cerclage aortique, à l'aide d'un cordon ombilical à 3cm au-dessus des ostia coronariens, et effectué dans le but d'obtenir un gradient systolique maximal d'au moins 15 mmHg, nécessaire au développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche sur une durée de 60 jours. Le péricarde et le thorax sont ensuite refermés en plusieurs couches. Une injection intramusculaire d'un analgésique (Buprénorphine, 0,6mg/ml; Reckitt Benckiser Healthcare Limited, Dansom Lane, UK) est donnée à la fin de la chirurgie et les animaux se réveillent dans une pièce isolée à température contrôlée.

Soins postopératoires

Les porcs sont traités avec l'antibiotique Excenel (0,06ml/kg) pour les 2 prochains jours et sont nourris avec une nourriture standard conçue pour les porcs. Pour les jours qui suivent, des doses additionnelles d'analgésique (Buprénorphine, 0,3 mg/ml) sont données aux porcs qui souffrent encore de la chirurgie.

Évaluation de l'hypertrophie ventriculaire gauche

Études échocardiographiques

Les porcs sont sédationnés (voir section précédente) pour des échocardiographies transthoraciques avant la chirurgie, afin d'obtenir des paramètres de base, et à la fin du traitement, juste avant le sacrifice. Les paramètres échocardiographiques : fonction ventriculaire droite et gauche et la masse du ventricule sont documentés par échocardiographie transthoracique en utilisant une sonde S3 (variant entre 1,6 à 3,2 MHz) avec un système échocardiographique standard (Sonos 5500 Hewlett-Packard, Andover, MA). Les dimensions de l'aorte ascendante au site du cerclage, 5mm proximement et distalement éloigné du cerclage sont mesurées sur l'axe long de la vue parasternale. Un doppler par ondes-continues est utilisé dans une vue modifiée de l'axe long apical du ventricule gauche afin de vérifier la vitesse maximale et le gradient au niveau du cerclage. Une étude en mode-M guidée par des vues en 2 dimensions du ventricule gauche et en 2 dimensions apicale puis des 4 chambres et des 2 chambres, est faite et enregistrée sur vidéo pour des mesures ultérieures. L'épaisseur du septum interventriculaire (IVS) et de la paroi postérieure du ventricule gauche (LVPW) ont été mesurés en mode-M à la fin de la diastole en utilisant en moyenne 3 cycles cardiaques. La masse du ventricule gauche a été calculée en utilisant cette formule : $\text{masse ventriculaire gauche} = 1,05 [(D + LVPW + IVS)^3 - D^3] - 14g$, où D représente la cavité du ventricule gauche et le diamètre à la fin de la diastole.

Sacrifices et dissection des artères coronaires épicaudiques

Après leur période respective de traitement, les porcs des 7 groupes sont anesthésiés en utilisant la même approche que décrite précédemment. Le sacrifice s'effectue par exsanguination par sternotomie médiane. Le cœur est enlevé et rapidement placé dans une solution Krebs-bicarbonate modifiée (composition en mmol/l : NaCl 118.3, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, EDTA 0.026, Dextrose 11.1; solution contrôle) pour la dissection des artères coronaires. L'interventriculaire antérieure, la circonflexe et la coronaire droite sont disséquées afin d'enlever la graisse et le tissu conjonctif, et sont divisées en anneaux de 4mm de longueur.

Les études de la réactivité vasculaire

Les anneaux sont placés dans des chambres d'organe remplies d'une solution de Krebs-bicarbonate (20 ml), maintenue à une température de 37°C et oxygénée avec un mélange de 95% O₂ / 5% CO₂. Les anneaux sont suspendus entre 2 étrières en métal dont un est connecté à un transducteur de force isométrique. Les données sont enregistrées sur un logiciel d'acquisition des données (IOS3, Emka Inc., Paris, France). Après 30 minutes de stabilisation, la tension sur les anneaux est progressivement augmentée à la tension optimale de sa courbe active de longueur-tension (approximativement 4,0 g), telle que déterminé par la mesure de la contraction au chlorure de potassium (KCl; 30 mmol/L) à différents degrés d'étirement. Une contraction maximale est déterminée avec le chlorure de potassium (KCl; 60 mmol/L) et les bains sont lavés par la suite. Les anneaux sont exclus s'ils n'ont pas contracté avec le KCl (taux d'exclusion de moins de 5%). Par la suite, toutes les études sont effectuées avec l'utilisation d'indométhacine (10⁻⁵ mol/L; afin d'éviter la production endogène de prostanoïdes), de propranolol (10⁻⁷ mol/L; afin d'éviter l'activation des récepteurs β-adrénergiques) et de la kétansérine (10⁻⁶ mol/L; incubé 45 minutes avant l'ajout de la sérotonine pour antagoniser les récepteurs à la sérotonine 5-HT₂ des cellules musculaires lisses). Après 45 minutes de stabilisation, la prostaglandine F_{2α} (variant de 2 X 10⁻⁶ à 10⁻⁵ mol/L) est ajoutée

afin d'atteindre une contraction moyenne de 50 % de la contraction maximale au KCl (60 mmol/L)

Les relaxations dépendantes de l'endothélium

La voie de signalisation de la relaxation induite par le NO a été étudiée par les courbes concentrations-réponse à la sérotonine (5-HT; 10^{-10} to 10^{-5} mol/L, un agoniste qui se lie aux récepteurs 5-HT_{1D} couplés aux protéines Gi et à la bradykinine (BK; 10^{-12} to 10^{-6} mol/L, un agoniste qui se lie aux récepteurs B₂ couplés aux protéines Gq endothéliales résultant ainsi en une libération de NO et d'EDHF).

Évaluation de la fonction de l'endothélium

Quantification des niveaux de GMPc des artères coronaires

Les niveaux de base de GMPc des artères coronaires épocardiques des contrôles et des porcs traités avec ou sans cerclage aortique, ont été mesurés afin d'évaluer la biodisponibilité du NO. Après la dissection des artères coronaires, quelques segments ont été congelés dans de l'azote liquide et conservés à -70°C jusqu'à ce que l'on mesure les niveaux de GMPc. Les échantillons ont ensuite été pulvérisés et resuspendus dans une solution de trichloroacétique (TCA; 6.25% w/vol) afin d'obtenir des membranes tissulaires, un précipité afin de le centrifuger à 3000 rpm pour 15 minutes à 4°C. Les surnageants ont ensuite été lavés avec du diéthyléther afin de préserver le GMPc et d'éliminer le TCA. Finalement, les surnageants lavés ont été asséchés à la chaleur avec du nitrogène afin d'obtenir du GMPc purifié. Les niveaux de GMPc ont été mesurés par un système d'immunoessai enzymatique sans acétylation (EIA) basé sur des anticorps anti-GMPc des lapins (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Qc, Canada). Les niveaux ont été ajustés afin de quantifier des protéines mesurées dans les tissus et ce en utilisant la technique de microessai Bradford Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Le « kit » de GMPc (Cayman Chemical, City State) a été utilisé afin de quantifier leurs niveaux.

Quantification des niveaux de nitrates/nitrites plasmatiques

Des échantillons sanguins ont été recueillis avant le sacrifice par le sinus coronaire et immédiatement centrifugés à 1,000 x g pour 15 min à 4° C. Le « kit » nitrates/nitrites de Cayman Chemical consiste en une méthode précise afin de mesurer les concentrations totales de nitrates/nitrites en deux étapes. La première étape est la conversion du nitrate en nitrite par l'utilisation de nitrate réductase. La seconde étape est l'addition d'un agent qui convertit le nitrite en protéine azo mauve. Des mesures photométriques de l'absorbance secondaire de cette protéine chromophore déterminent les concentrations de NO_2^- .

Évaluation du stress oxydant

Quantification des niveaux plasmatiques d'angiotensine II

Des échantillons sanguins ont été recueillis avant le sacrifice par le sinus coronaire et immédiatement centrifugés à 1,000 x g pour 15 min à 4° C. La méthode de la phase renversée avec les colonnes remplies de phénylsilylsilica est utilisée afin d'extraire le plasma des échantillons. Des mesures quantitatives de l'angiotensine II ont été évaluées par un « kit » de radioimmunoessai ang ^{125}I -angiotensin II (Angiotensin II Assay kit, Cayman Chemical). Ce « kit » consiste en l'immobilisation d'un monoclonal anti-Angiotensine II dans 96 puits. Après une réaction immunologique avec l'angiotensine II, la molécule capturée est liée de façon covalente par le glutéraldéhyde via des groupes amino. Après un traitement de dénaturation, l'angiotensine II peut réagir avec l'acétylcholinestérase mAb et agir comme un traceur. Celui-ci agit avec un substrat enzymatique pour l'ACh et le chromogène et forment un produit jaune dont l'intensité est analysée en spectrophotométrie. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité du traceur et à la quantité d'angiotensine II.

Quantification des niveaux de protéines carbonyl

Des échantillons sanguins ont été recueillis avant le sacrifice par le sinus coronaire et immédiatement centrifugés à 1,000 x g pour 15 min à 4° C. L'indicateur le plus utilisé de l'oxydation des protéines sont les protéines carbonyls. Les cations des cycles de rédox tels que Fe^{2+} et Cu^{2+} peuvent se lier sur les protéines par les sites de liaisons des cations et avec l'ajout d' H_2O_2 et d' O_2 peuvent transformer les chaînes des groupes amines sur plusieurs amino acides (i.e., lysine, arginine, proline ou histidine) en carbonyl. Des mesures quantitatives des protéines carbonyl ont été évaluées par le « kit » de protéine carbonyl (Cayman Chemical). La méthode utilisée consiste en une réaction entre le 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) et les protéines carbonyl. DNPH réagit avec les protéines carbonyl, formant une base Schiff afin de produire l'hydrazone correspondant qui a été analysé par spectrophotométrie à des absorbances de 360 ou 385nm.

Analyse des lipides et des lipoprotéines

Des échantillons ont été prélevés d'une veine périphérique afin de mesurer les niveaux le cholestérol plasmatique total, les lipoprotéines de basses densités (LDL), les lipoprotéines de hautes densités (HDL) et les niveaux de triglycérides par le laboratoire de l'Institut de Cardiologie de Montréal en suivant des protocoles établis.

Médicaments

Toutes les solutions ont été préparées quotidiennement. La 5-hydroxytryptamine créatinine sulfate (sérotonine), bradykinine, EDTA, indométhacine, kétansérine, propranolol, prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, mannitol et méthanol ont été achetés de Sigma (Oakville, ON, Canada). EGTA a été acheté de MP Biochemicals (Aurora, OH, USA) et le sucrose de EMD Chemicals (Gibbstown, NJ, USA). Le placebo a été acheté d'ODAN Laboratoires Ltée (Montréal, Qc, Canada). L'atorvastatine a été donnée par Pfizer.

Analyses statistiques et interprétation des données

Les relaxations et les contractions sont exprimées en pourcentage de la contraction à la prostaglandine $F_{2\alpha}$ pour chaque groupe et présenté comme une moyenne \pm la déviation standard (SEM). Des études ANOVA ont été faites afin de comparer les courbes concentrations-réponse. Les études d'ANOVA ont été suivies par les comparaisons des paires de Dunnet, en se basant sur le groupe non traité ayant un cerclage aortique comme groupe de référence afin de comparer la production basale de GMPc, les niveaux de nitrites/nitrates, d'angiotensine II et de protéines carbonyl. Une valeur de p plus petite que 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. EC_{50} et E_{max} ont été mesurés pour chaque courbe concentrations-réponse en utilisant une fonction logistique à 5 paramètres avec un logiciel « Sigma-Plot curve fitting ». Pour ces paramètres, les différences entre les groupes sont évaluées avec un Student t test non couplé. Une valeur de p plus petite que 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

RÉSULTATS

Résultats échocardiographiques

Après 60 et 90 jours de cerclage aortique, le développement d'hypertrophie ventriculaire gauche est observé chez les groupes ayant eu un cerclage aortique, ceci est démontré par le rapport de la masse du ventricule gauche sur la masse corporelle du porc. Des augmentations significatives de cette valeur par rapport au groupe témoin ($3,39 \pm 0,28$ g/kg) et celui sans cerclage et traité 80 mg ($3,4 \pm 0,5$ g/kg) prouve le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche chez tous les groupes avec cerclage; $p < 0,05$ groupe 2 ($4,59 \pm 0,25$ g/kg), groupe 3 ($4,09 \pm 0,25$ g/kg), groupe 4 ($4,5 \pm 0,5$ g/kg), groupe 5 ($5,06 \pm 0,2$ g/kg) et groupe 6 ($5,13 \pm 0,2$ g/kg). De plus, on retrouve une augmentation significative ($p < 0,05$) de ce même rapport entre les groupes avec cerclage pour 90 jours (groupe 5 ($5,06 \pm 0,2$ g/kg) et groupe 6 ($5,13 \pm 0,2$ g/kg)) versus les groupes avec cerclage pour 60 jours ($4,59 \pm 0,25$ g/kg). (Tableau II)

Groupes	Poids début (kg)	Poids fin (kg)	Masse du VG début (g)	Masse VG fin (g)	VG/ MC fin (g/kg)
Témoin	$22,2 \pm 0,7$	$36,1 \pm 1,2$	$92,2 \pm 1$	$122,3 \pm 2$	$3,39 \pm 0,28$
HVG contrôle 60 jours	$23,5 \pm 0,5$	$35,8 \pm 1,8$	$86,5 \pm 3$	$119,9 \pm 2$	$4,59 \pm 0,25^*$
HVG tx 40mg pour 60 jours; 0→60 d	$25,2 \pm 3,5$	$45,3 \pm 2,1^*$	$80,6 \pm 2$	$184,2 \pm 4^*$	$4,09 \pm 0,5^*$
HVG tx 80 mg pour 60 jours; 0→60 d	$20,9 \pm 0,5$	$42,6 \pm 2,3^*$	77 ± 3	$193,4 \pm 5^*$	$4,5 \pm 0,5^*$
HVG contrôle 90 jours	$26,2 \pm 2,7$	$59,2 \pm 2,4^*$	78 ± 3	$300,8 \pm 3^*$	$5,06 \pm 0,2^{*o}$
HVG tx 80 mg pour 30 jours; 60→90 d	$24,4 \pm 0,7$	$56,5 \pm 1,4^*$	$65,8 \pm 3$	$290,6 \pm 4^*$	$5,13 \pm 0,2^{*o}$
PAS HVG tx 80 mg pour 60 jours	$20,9 \pm 0,5$	$42,6 \pm 1,7^*$	$70,7 \pm 2$	$145,4 \pm 2$	$3,4 \pm 0,5$

Tableau II. Données échocardiographiques. Les données sont présentées comme moyenne \pm SEM; VG: ventricule gauche; HVG: Hypertrophie ventriculaire gauche; MC : Masse corporelle; $^*p < 0,05$ pour les groupes avec cerclage aortique comparé au témoin. $^o p < 0,05$ pour les groupes avec cerclage 90 jours versus les groupes avec cerclage 60 jours.

Les données échocardiographiques sont significativement augmentées ($p < 0,05$) pour les valeurs de vélocité maximale des groupes avec cerclage 60 et 90 jours; groupe 2 ($319,3 \pm 7$ cm/s), groupe 3 ($295,6 \pm 12,3$ cm/s), groupe 4 (301 ± 15 cm/s), groupe 5 ($429,5 \pm 8$ cm/s), groupe 6 (435 ± 4 cm/s) versus le groupe témoin ($132 \pm 2,7$ cm/s) et celui sans cerclage traité avec 80 mg ($125,3 \pm 7,2$ cm/s). On retrouve également une augmentation significative du gradient maximal des groupes avec cerclage 60 et 90 jours; groupe 2 ($45,6 \pm 5,2$ mmHg), groupe 3 ($45,2 \pm 4,1$ mmHg), groupe 4 ($40,7 \pm 6,2$ mmHg), groupe 5 ($64,8 \pm 4$ mmHg) et groupe 6 ($58,3 \pm 5$ mmHg) versus le groupe témoin ($6,98 \pm 0,3$ mmHg) et celui sans cerclage traité avec 80 mg ($6,4 \pm 0,6$ mmHg). De plus, on retrouve une augmentation significative de ces deux derniers paramètres entre les groupes ayant eu un cerclage pour 90 jours versus 60 jours.

D'autres différences significatives sont démontrées par rapport à l'augmentation de l'épaisseur du septum interventriculaire et de celui de la paroi postérieure du ventricule gauche :

VG IVS : $p < 0,05$ groupe 2 ($1,1 \pm 0,04$ g), groupe 3 ($0,9 \pm 0,07$ g), groupe 4 ($0,9 \pm 0,08$ g), groupe 5 ($2,1 \pm 0,1$ g) et groupe 6 ($1,9 \pm 0,6$ g) versus le groupe témoin ($0,85 \pm 0,1$ g) et celui sans cerclage et traité avec 80 mg ($0,8 \pm 0,1$ g). De plus, il y a une augmentation significative entre l'épaisseur des septums interventriculaires des groupes avec cerclage pour 90 jours versus 60 jours.

VGPW: $p < 0,05$ groupe 2 ($0,9 \pm 0,07$ g), groupe 3 ($0,99 \pm 0,6$ g), groupe 4 ($0,98 \pm 0,1$ g), groupe 5 ($1,8 \pm 0,2$ g) et groupe 6 ($1,7 \pm 0,1$ g) versus le groupe témoin ($0,7 \pm 0,1$ g) et celui sans cerclage et traité avec 80 mg ($0,72 \pm 0,06$ g). De plus, il y a une différence significative entre l'épaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche des groupes avec cerclage pour 90 jours versus 60 jours. (Tableau III)

Groupes	Témoin	HVG contrôle 60 jours	HVG tx 40 mg 60 d à partir d 0	HVG tx 80 mg 60 d à partir d 0	HVG contrôle 90 jours	HVG tx 80 mg 30 d à partir d 60	Sans HVG tx 80 mg 60 jours
Vélocité maximale (cm/s) ¹	132 ± 2,7	319,3 ± 7*	295,6±12,3*	301± 15*	429,5±8* ^o	435± 4* ^o	125,3± 7,2
Gradient maximal (mmHg) ²	6,98 ± 0,3	45,6± 5,2*	45,2 ± 4,1*	40,7± 6,2*	64,8± 4* ^o	58,3± 5* ^o	6,4 ± 0,6
VG FS, %	36,3 ± 4	40,6 ± 2	42,95 ± 1	35,7± 8,3	48,03 ± 5	45,7± 3,8	38,1 ± 3,9
FEVG, %	65,5 ± 5,3	64,6 ± 3,2	63,5 ± 2	64,1± 5	63 ± 4,2	62,1± 3,6	68 ± 4,9
VG IVS, g	0,85 ± 0,1	1,1± 0,04*	0,99 ± 0,6*	0,98± 0,1*	2,1± 0,1* ^o	1,9± 0,6* ^o	0,8 ± 0,1
VG PW, g	0,7 ± 0,1	0,9± 0,07*	0,98± 0,04*	0,9±0,08*	1,8± 0,2* ^o	1,7± 0,1* ^o	0,72± 0,06

Tableau III. Données échocardiographiques présentées comme moyenne ± SEM; ¹au site de cerclage de l'aorte ascendante; ² au site de cerclage de l'aorte ascendante; VG : Ventricule gauche; FS : Fraction de raccourcissement; FE : Fraction d'éjection; IVS : Septum interventriculaire; PW : Paroi postérieure du ventricule gauche. *p<0,05 des groupes avec cerclage (HVG) comparés au témoin. ^op<0,05 des groupes avec cerclage 90 jours (HVG) versus groupes avec cerclage 60 jours.

Les niveaux lipidiques

Aucune différence significative n'a été identifiée entre les groupes pour les réductions de cholestérol et du ratio cholestérol/LDL ainsi que pour les HDL et triglycérides (p>0,05).

Les études de réactivité vasculaire

Contractions

Les niveaux de contractions maximales au KCl (21 ± 2,3 g), au PGF_{2α} (11 ± 1,9 g) ainsi que le ratio PGF_{2α} / KCl (0,52 ± 0,8 g) n'étaient pas différents entre les groupes (p>0,05).

Relaxations dépendantes de l'endothélium

La courbe concentrations-réponse du groupe HVG contrôle 60 jours montre une diminution significative des relaxations dépendantes de l'endothélium qui impliquent la voie de signalisation de la protéine G_i à des concentrations de 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} et pour la voie de signalisation de la protéine G_q à des concentrations de 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} versus le groupe témoin (Figures 10, 11, 12, 13, 14 et 15).

Les courbes concentrations-réponse des anneaux d'artères coronaires épicaudiques des groupes traités avec l'atorvastatine 40 et 80 mg pour 60 jours en débutant au jour 0 ont montrées une diminution significative des relaxations dépendantes de l'endothélium qui impliquent la voie de signalisation de la protéine G_i (sérotonine) aux concentrations de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} pour les doses de 40 et 80 mg versus les groupes HVG contrôle 60 jours et entre elles et à des concentrations de 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} versus le groupe témoin ($p < 0.05$) (Figure 10) et à des concentrations de 10^{-7} , 10^{-6} pour le groupe traité avec 80 mg et à des concentrations de 10^{-9} et 10^{-8} pour celui traité avec 40 mg ($p < 0,05$) pour les relaxations dépendantes de l'endothélium qui résulte de l'activation de la voie de signalisation de la protéine G_q (bradykinine) versus les groupes HVG contrôle 60 jours et témoin et à des concentrations de 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} entre elles (Figure 11).

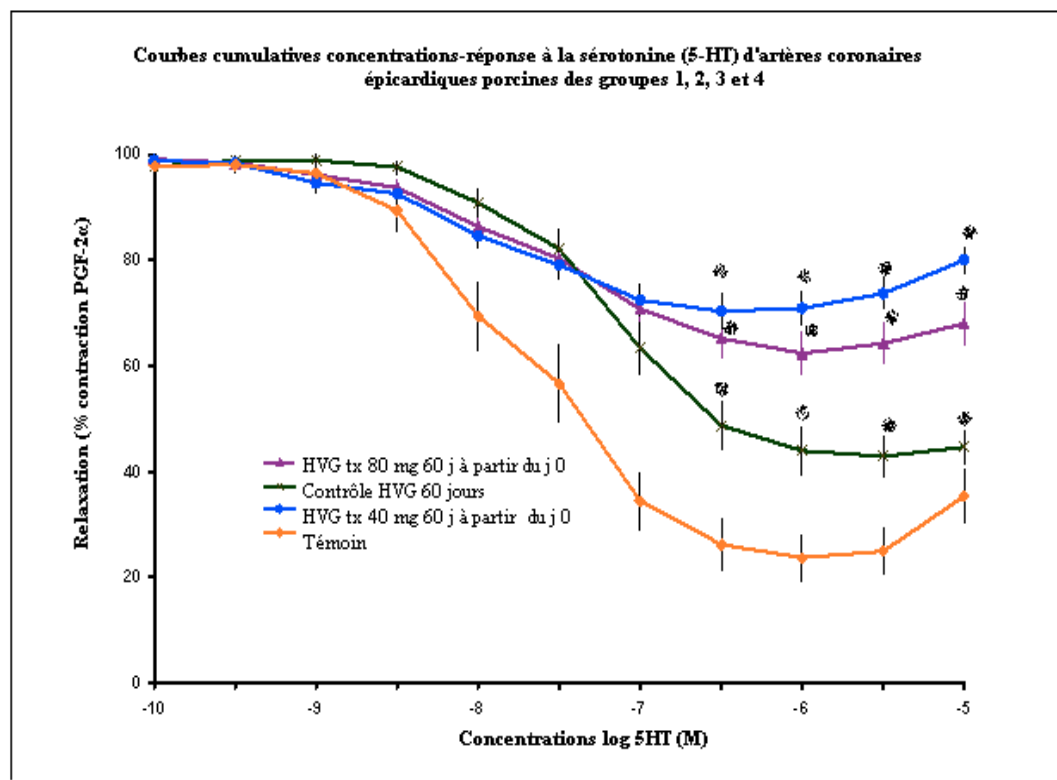


Figure 10: Les courbes cumulatives concentrations-réponse à la sérotonine des anneaux des artères coronaires épicaudiques porcines du groupe témoin (1), du groupe contrôle 60 jours (2), du groupe traité avec atorvastatine 40 mg du jour 0 post-cerclage pour 60 jours (3), du groupe traité avec atorvastatine 80 mg du jour 0 post-cerclage pour 60 jours (4). Les réponses sont données comme pourcentage de relaxation à la contraction induite par la prostaglandine $F_{2\alpha}$. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ groupes 3 et 4 vs 2 et 1 et 2, 3, 4 versus 1 témoin et groupe 2 versus 1; CA : cerclage aortique.

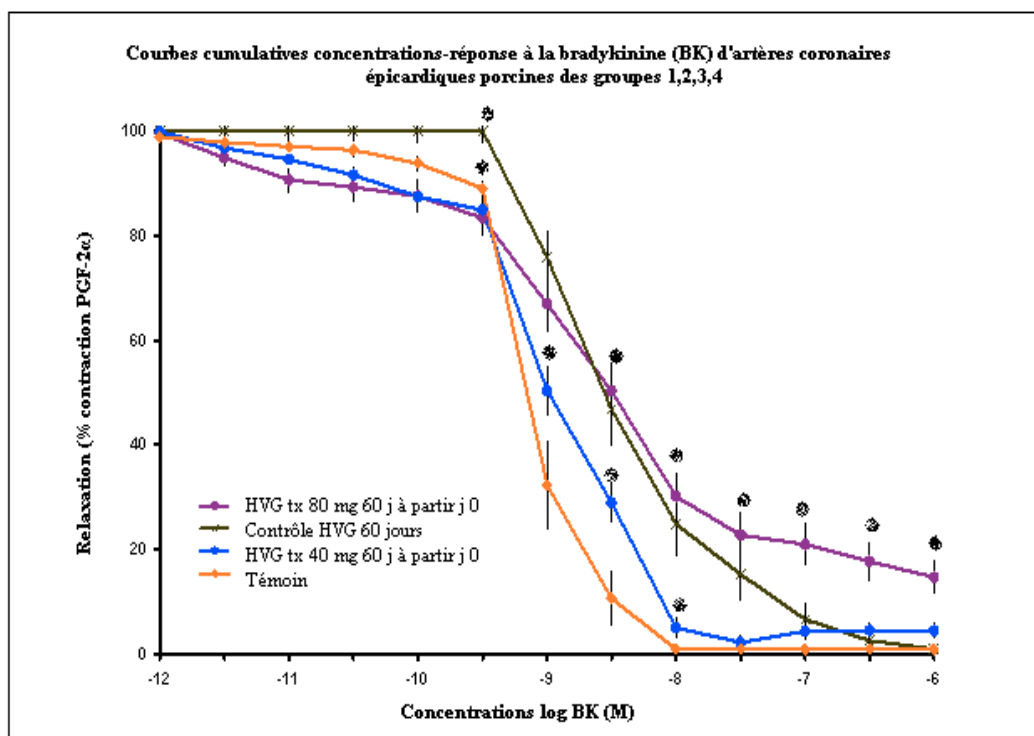


Figure 11: Les courbes cumulatives concentrations-réponse à la bradykinine des anneaux des artères coronaires épicaudiques porcines du groupe témoin (1), du groupe contrôle 60 jours (2), du groupe traité avec atorvastatine 40 mg du jour 0 post-cerclage pour 60 jours (3), du groupe traité avec atorvastatine 80 mg du jour 0 post-cerclage pour 60 jours (4). Les réponses sont données comme pourcentage de relaxation à la contraction induite par la prostaglandine F_{2α}. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm SEM. *p<0,05 groupes 3 et 4 vs 2 et 1 et 2, 3, 4 vs 1 témoin et 2 versus 1; CA : cerclage aortique.

Il y a aussi une diminution significative des relaxations dépendantes de l'endothélium impliquant la voie de signalisation de la protéine G_i (sérotonine) chez le groupe traité avec l'atorvastatine 80 mg du jour 60 au jour 90 aux concentrations de 10^{-6} and 10^{-5} versus les groupes HVG contrôle 90 jours et à des concentrations de 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} pour ces deux derniers groupes versus les groupes HVG 60 jours et témoin (Figure 12). Une diminution significative des relaxations dépendantes de l'endothélium impliquant la voie de signalisation de la protéine G_q (bradykinine) chez le groupe traité avec l'atorvastatine 80 mg du jour 60 au jour 90 aux concentrations de 10^{-10} et 10^{-9} versus le groupe HVG contrôle 90 jours et à des concentrations de 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} pour les groupes HVG contrôle 60 et 90

jours et celui traité 80 mg du jour 60 au jour 90 versus le groupe témoin (Figure 13).

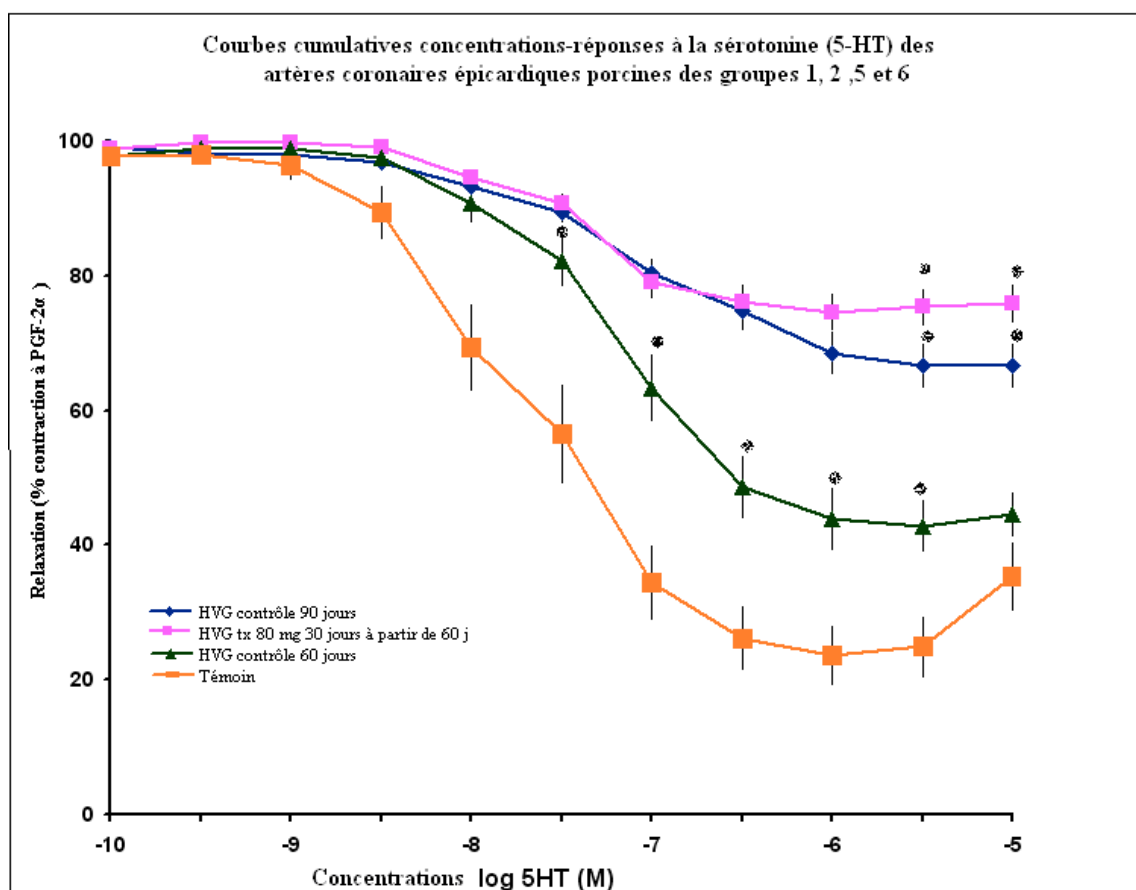


Figure 12 : Les courbes cumulatives concentrations-réponse à la sérotonine des anneaux des artères coronaires épicaudiques porcines du groupe contrôle 90 jours (5), du groupe traité avec atorvastatine 80 mg pour 30 jours à partir du jour 60 post-cerclage (6). Les réponses sont données comme pourcentage de relaxation à la contraction induite par la prostaglandine $F_{2\alpha}$. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ groupe 6 vs 5 contrôle HVG 90 jours et 2,5 et 6 versus 1; CA : cerclage aortique.

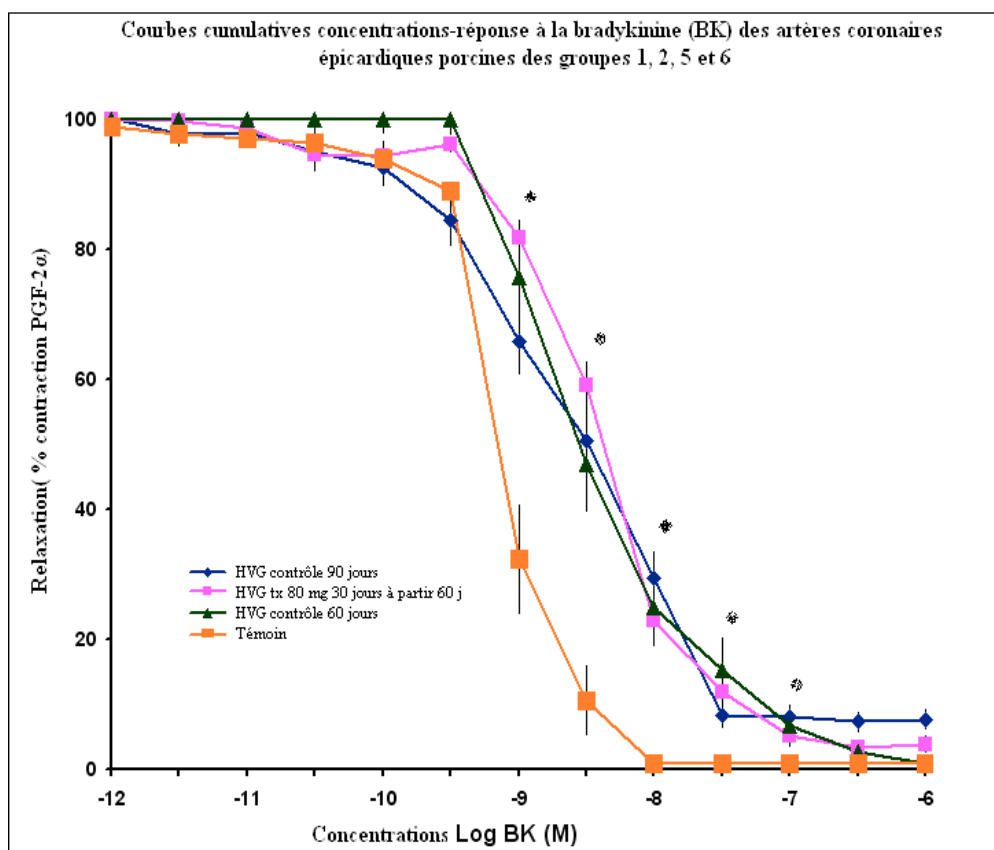


Figure 13 : Les courbes cumulatives concentrations-réponse à la bradykinine des anneaux des artères coronaires épicaudiques porcines du groupe contrôle 90 jours (5), du groupe traité avec atorvastatine 80 mg pour 30 jours à partir du jour 60 post-cerclage (6). Les réponses sont données comme pourcentage de relaxation à la contraction induite par la prostaglandine $F_{2\alpha}$. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ groupe 6 vs 5 HVG contrôle 90 jours et 2, 5 et 6 versus 1; CA : cerclage aortique.

On retrouve une diminution significative des relaxations dépendantes de l'endothélium impliquant la voie de signalisation de protéine G_i (sérotonine) chez le groupe sans cerclage, mais traité avec atorvastatine 80 mg pour 60 jours à des concentrations de 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} comparé au groupe témoin à des concentrations de 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} versus les groupes HVG contrôle 60 jours (Figure 14) et aussi une diminution significative des relaxations dépendantes de l'endothélium impliquant la voie de signalisation de la protéine G_q (bradykinine) chez le groupes sans cerclage, mais traité avec atorvastatine 80 mg pour 60 jours et chez le groupe HVG contrôle 60 jours aux concentrations de 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} versus le groupe témoin (Figure 15).

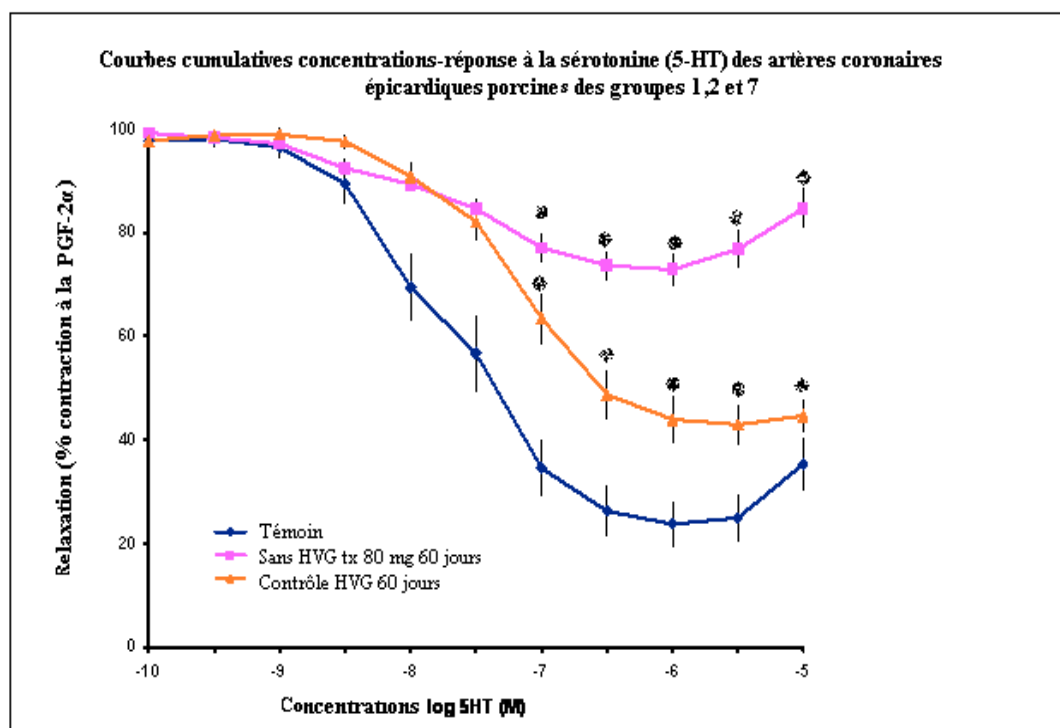


Figure 14 : Les courbes cumulatives concentrations-réponse à la sérotonine des anneaux des artères coronaires épicaardiques porcines du groupe témoin (1), du groupe contrôle 60 jours (2), du groupe sans cerclage aortique traité avec atorvastatine 80 mg pour 60 jours (7). Les réponses sont données comme pourcentage de relaxation à la contraction induite par la prostaglandine $F_{2\alpha}$. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ groupes 2 et 7 versus 1 et 7 versus 2; CA : cerclage aortique.

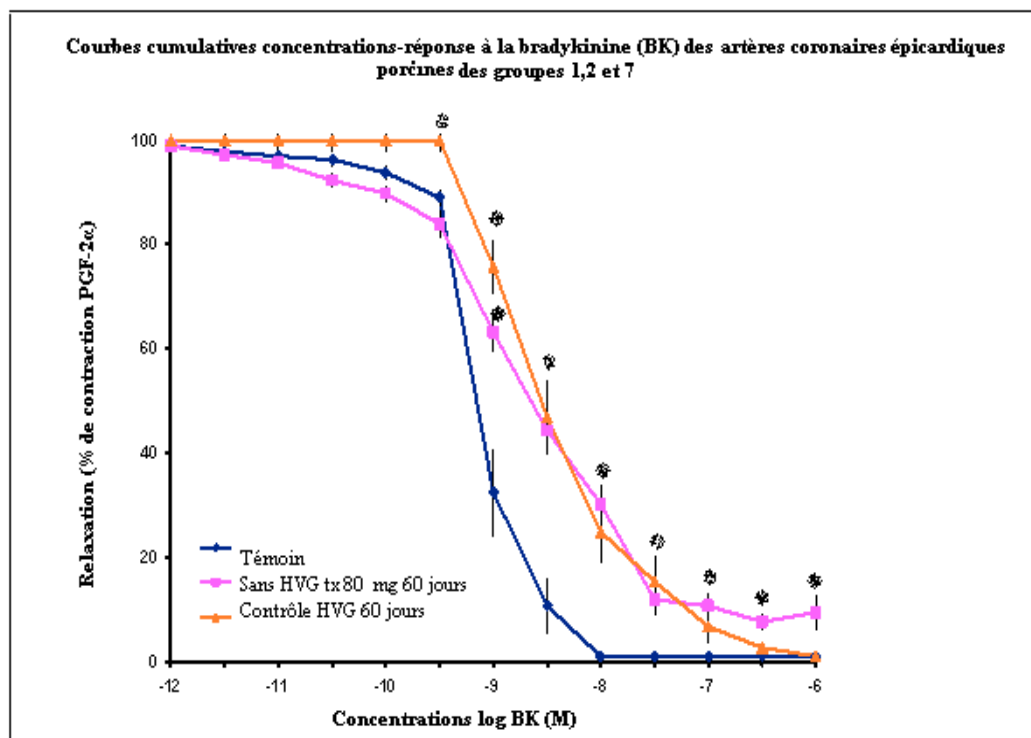


Figure 15 : Les courbes cumulatives concentrations-réponse à la bradykinine des anneaux des artères coronaires épicaardiques porcines du groupe témoin (1), du groupe contrôle 60 jours (2), du groupe sans cerclage aortique traité avec atorvastatine 80 mg pour 60 jours (7). Les réponses sont données comme pourcentage de relaxation à la contraction induite par la prostaglandine $F_{2\alpha}$. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ groupes 2 et 7 vs 1 et 7 versus 2, témoin; CA : cerclage aortique.

Évaluation de la fonction endothéliale

Quantification des niveaux de GMPc des artères coronaires

La biodisponibilité du NO, évaluée par les niveaux de GMPc, est significativement diminuée chez les groupes traités comparés aux contrôles. Les niveaux de GMPc sont significativement diminués dans les groupes avec cerclage aortique traités avec l'atorvastatine 40 et 80 mg pour 60 jours en débutant au jour 0 ($16,36 \pm 0,41$ pmol/mg protéines et $5,29 \pm 0,36$ pmol/mg protéines) comparé au groupe contrôle 60 jours (22 ± 2 pmol/mg protéines) et témoin ($p < 0,05$). Ces niveaux sont aussi significativement diminués chez le groupe sans cerclage, mais traités avec atorvastatine 80 mg pour 60 jours ($3,03 \pm 0,27$ pmol/mg protéines) comparé au groupe contrôle 60 jours (22 ± 2 pmol/mg protéines) et au groupe témoin ($35 \pm 4,9$

pmol/mg protéines) respectivement ($p < 0,05$). Les niveaux de cGMP des groupes avec cerclage 60 et 90 jours sont diminués significativement comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Les niveaux de GMPc sont aussi diminués, mais non statistiquement significatifs entre eux, chez le groupe contrôle 90 jours ($1,02 \pm 0,48$ pmol/mg protéines) et celui traité pour 30 jours à partir du jour 60 avec l'atorvastatine 80 mg ($1,2 \pm 0,5$ pmol/mg protéines) cependant, les niveaux de cGMP de ces deux derniers groupes sont diminués significativement comparé au groupe HVG contrôle 60 jours et témoin ($p < 0,001$) (Figure 16).

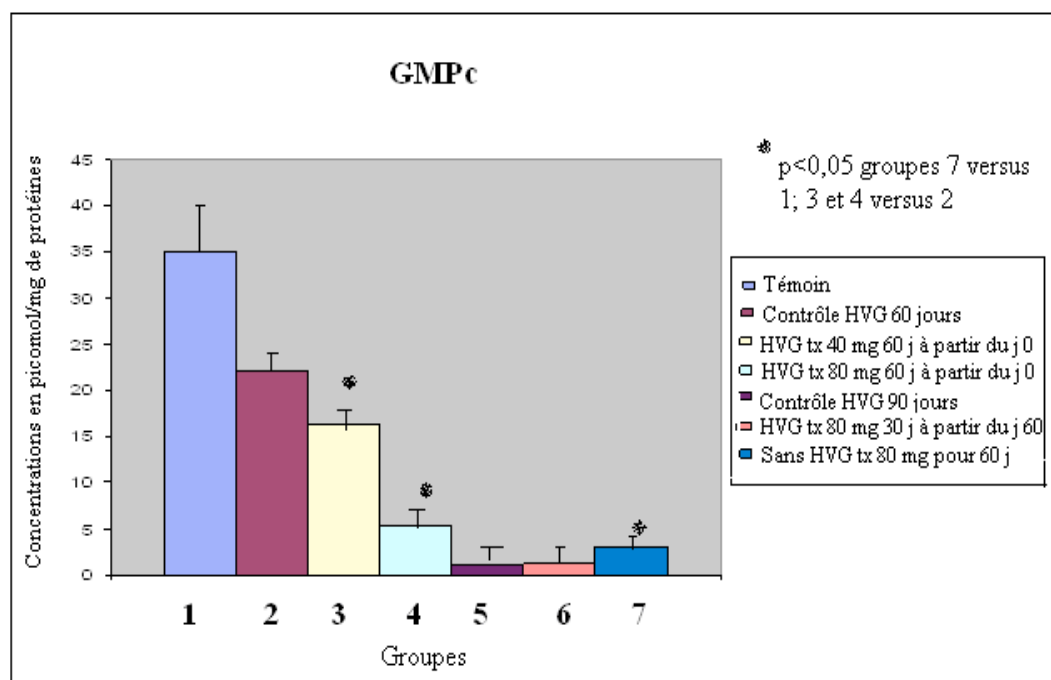


Figure 16 : Influence d'un traitement avec l'atorvastatine sur les niveaux de GMPc vasculaires. Les résultats sont présentés comme une moyenne \pm SEM. N=6 pour tous les groupes. $P < 0,05$ groupe 3, 4 versus 2, groupe 5, 6 versus 2, groupe 7 versus 1 et groupe 2, 3, 4, 5, 6 versus 1.

Quantification des niveaux de nitrates/nitrites

Il y a une diminution significative des niveaux de nitrites chez le groupe 7 ($12,8 \pm 0,32$ uM de protéines) sans HVG, mais traité avec 80 mg d'atorvastatine pour 60 jours versus le groupe 1 témoin ($13,9 \pm 0,34$ uM de protéines) ($p < 0,05$). On retrouve une diminution significative des niveaux de nitrites entre les groupes 2 ($12,3 \pm 0,7$ uM de protéines), 3 ($11,68 \pm 0,4$ uM de protéines), 4 ($11,81 \pm 0,19$ uM de protéines), 5 ($11,75 \pm 0,48$ uM de protéines) et 6 ($11,76 \pm 0,4$ uM de protéines) versus les groupes 1 et 7 ($p < 0,05$) (Figure 17).

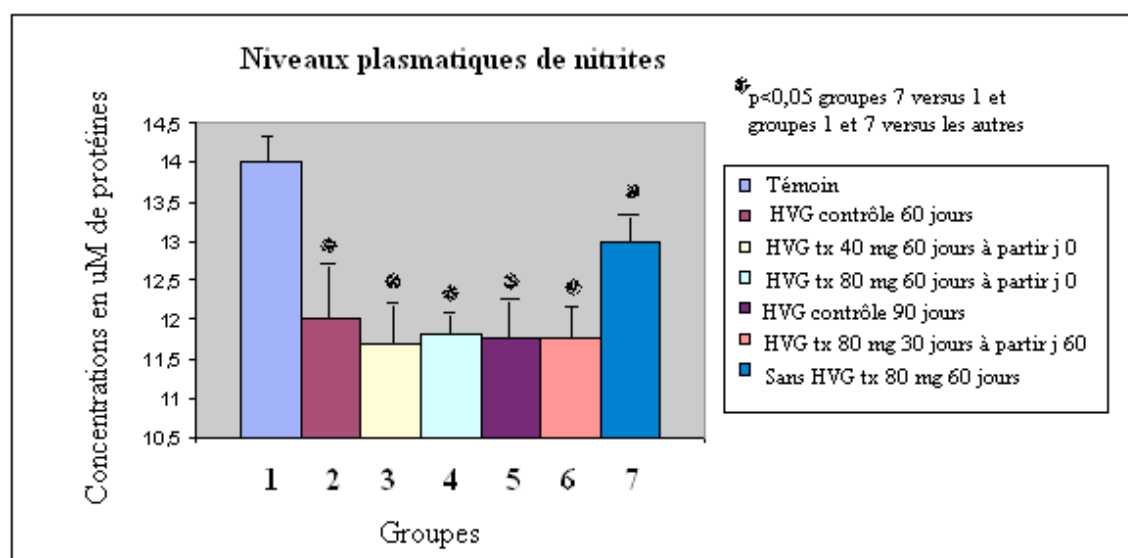


Figure 17 : Influence d'un traitement avec l'atorvastatine sur les niveaux de nitrites plasmatiques. Les résultats sont présentés comme une moyenne \pm SEM. N=6 pour tous les groupes. $p < 0,05$ groupe 7 versus 1 et 2, 3, 4, 5 et 6 versus 1 et 7.

Quantification du stress oxydant

Niveaux d'angiotensine II plasmatique

Les niveaux d'angiotensine II plasmatique sont significativement augmentés ($p < 0,01$) chez le groupe traité avec l'atorvastatine 80 mg pour 30 jours à partir du jour 60 ($72,78 \pm 12,4$ pg/ml protéines) comparé aux groupes contrôle 60 et 90 jours et témoin ($38 \pm 4,8$ pg/ml protéines) et chez le groupe sans cerclage traité avec

l'atorvastatine 80 mg pour 60 jours ($45,77 \pm 6,3$ pg/ml protéines) comparé au groupe témoin (5 ± 1 pg/ml protéines) ($p < 0,01$). Aussi, les niveaux d'angiotensine des groupes contrôles 60 jours (35 ± 5 pg/ml protéines) et 90 jours ($38 \pm 4,8$ pg/ml protéines) et des groupes 3 ($52,9 \pm 27$ pg/ml protéines) et 4 ($31,7 \pm 10$ pg/ml protéines) sont significativement augmentés comparé au groupe témoin (5 ± 1 pg/ml protéines) ($p < 0,01$) (Figure 18).

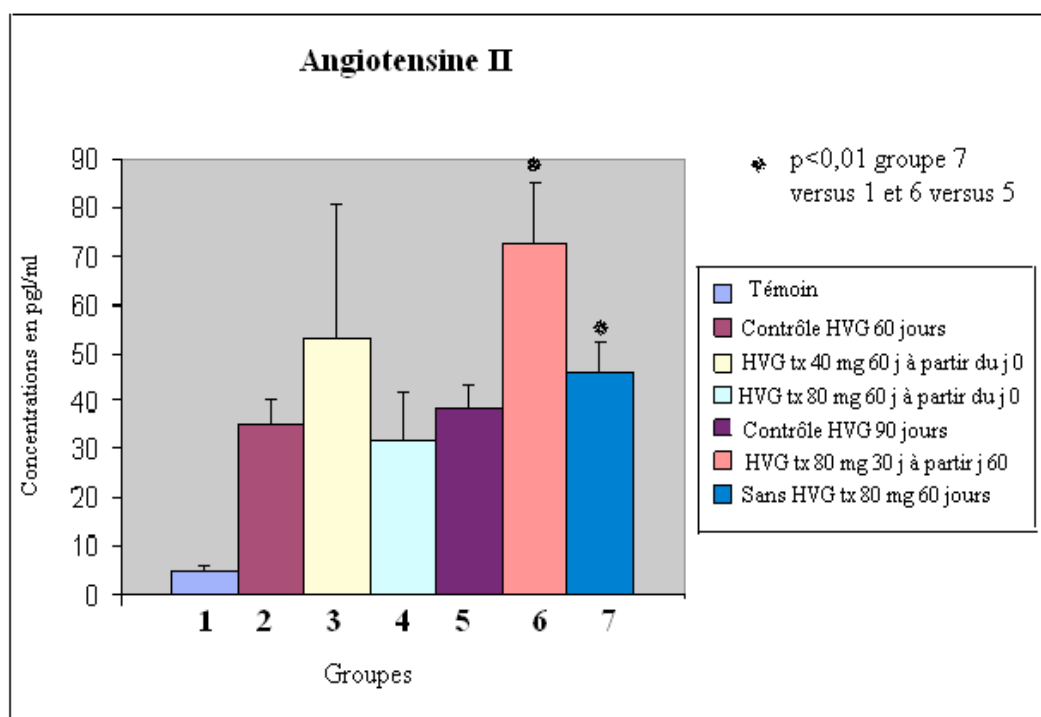


Figure 18 : Influence d'un traitement avec l'atorvastatine sur les niveaux d'ANG II plasmatiques. Les résultats sont présentés comme une moyenne \pm SEM. N=6 pour tous les groupes. $P < 0,01$ groupe 6 versus 1, 2 et 5 et groupes 2, 3, 4, 5, 6 versus 1 et groupe 7 versus 1.

Niveaux de protéines carbonyl

Les niveaux de protéines carbonyl sont significativement augmentés chez le groupe sans cerclage et traité avec l'atorvastatine 80 mg pour 60 jours ($0,275 \pm 0,001$ nmol/ml) comparé au groupe témoin ($1,46 \pm 0,6$ nmol/ml) ($p < 0,05$). Les niveaux de protéines carbonyl n'étaient pas augmentés de façon significative chez les autres

groupes traités et contrôle 60 et 90 jours ($p>0,05$) cependant, ils l'étaient comparativement au groupe témoin ($p<0,05$) (Figure 19).

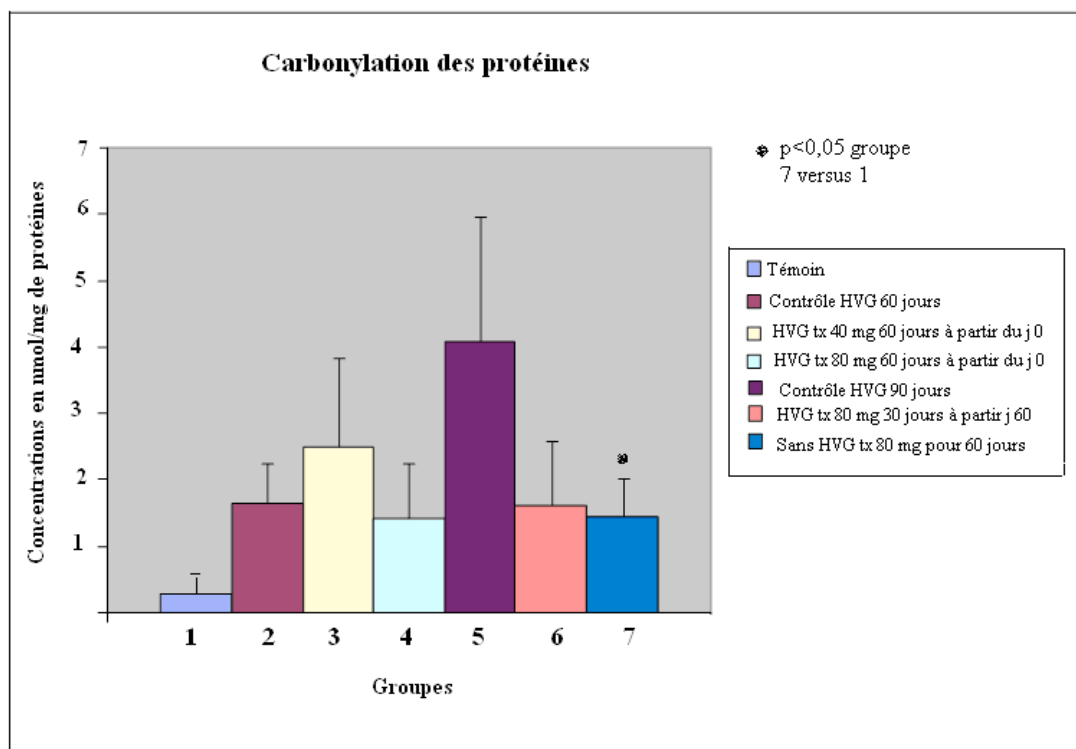


Figure 19 : Influence d'un traitement avec l'atorvastatine sur les niveaux de protéines carbonyl plasmatiques. Les résultats sont présentés comme une moyenne \pm SEM. N=6 pour tous les groupes. $P<0,01$ groupe 7 vs groupe 1 témoin et 2, 3, 4, 5, 6 versus 1.

Résultats de pD_2 (le log négatif de EC_{50}) et de E_{max} (le pourcentage maximal de relaxation)

Il y a une différence significative entre les niveaux de E_{max} (i.e diminution du pourcentage de la relaxation maximale) à la sérotonine pour les groupes traités avec 40 mg ($21,2 \pm 10,26 \%$) et 80 mg ($34,6 \pm 5,12 \%$) pour 60 jours en partant du jour 0 et le groupe contrôle 60 jours ($54,64 \pm 4,67 \%$) ($p<0,05$). Il en est de même pour cette diminution du pourcentage de relaxation maximale, pour le groupe traité avec l'atorvastatine 80 mg pour 30 jours en partant du jour 60 ($24,01 \pm 2,96 \%$) comparé au contrôle 90 jours ($33,34 \pm 3,42 \%$) ($p<0,05$) et entre le groupe sans cerclage et traité avec 80 mg ($57,84 \pm 9 \%$) et le groupe témoin ($74,87 \pm 3,48 \%$) ($p<0,05$). Finalement, on note une diminution significative des relaxations maximales chez

tous les groupes comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Il existe aussi une diminution statistiquement significative du pourcentage de relaxation maximale dans les niveaux de Emax à la bradykinine chez le groupe traité avec l'atorvastatine 80 mg pour 60 jours en débutant au jour 0 ($78 \pm 5,3 \%$) comparé au groupe contrôle 60 jours ($91,47 \pm 1,3 \%$) ($p < 0,05$). Aussi, pour le groupe sans cerclage traité avec 80 mg ($94 \pm 1,7 \%$) comparé au groupe témoin ($100 \pm 0 \%$) ($p < 0,05$) et finalement pour les groupes HVG contrôle 60 jours, HVG tx 80 mg 60 jours et HVG 90 jours contrôle et traité 80 mg pour 30 jours à partir du jour 60 comparé au groupe témoin ($p < 0,05$).

Pour ce qui est du pD_2 à la sérotonine et à la bradykinine, il n'y a aucune différence statistiquement significative entre les groupes (Tableau IV).

		<u>pD_2 (log nég EC_{50})</u>		<u>Emax (%)</u>	
		Sérotonine	Bradykinine	Sérotonine	Bradykinine
Groupes					
1	Témoin	$6,93 \pm 0,13$	$8,32 \pm 0,14$	$74,87 \pm 3,48$	100 ± 0
2	HVG contrôle 60 jours	$7,01 \pm 0,11$	$9,08 \pm 0,06$	$54,64 \pm 4,67$	$91,47 \pm 1,3$
3	HVG tx 40mg pour 60 jours; 0→60 d	$7,6 \pm 0,14$	$8,81 \pm 0,16$	$21,2 \pm 2,26^*$	100 ± 0
4	HVG tx 80 mg pour 60 jours; 0→60 d	$7,19 \pm 0,13$	$7,56 \pm 0,44$	$34,6 \pm 5,12^*$	$78 \pm 5,3^*$
5	HVG contrôle 90 jours	$6,77 \pm 0,3$	$8,73 \pm 0,24$	$33,34 \pm 3,42$	$93 \pm 1,64$
6	HVG tx 80 mg pour 30 jours; 60→90 d	$7,3 \pm 0,25$	$8,51 \pm 0,07$	$24,01 \pm 2,96^*$	$93,78 \pm 1,3$
7	PAS HVG tx 80 mg pour 60 jours	$6,24 \pm 0,8$	$9,17 \pm 0,19$	$57,84 \pm 9^*$	$94 \pm 1,66^*$

Tableau IV : Résultats des pD_2 et des Emax. Les données sont présentées comme moyenne \pm SEM. Emax indique le pourcentage de relaxation maximale; pD_2 , le log négatif de EC_{50} . $*p < 0,05$ pour les groupes traités versus contrôles ou témoin.

DISCUSSION

Les trouvailles majeures de ce projet dans ce modèle porcin sont que l'atorvastatine 1) n'empêche pas le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche; 2) n'améliore pas la relaxation dépendante de l'endothélium des artères coronaires épicaudiques, mais qu'à l'opposé, la dysfonction endothéliale s'en trouve aggravée; 3) n'augmente pas la biodisponibilité du monoxyde d'azote; 4) ne diminue pas le stress oxydant.

Le choix de l'utilisation de l'atorvastatine s'explique par le fait qu'elle est la statine la plus utilisée chez la population et qu'elle est celle qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études. La dose 80 mg dans notre étude est justifiée, entre autre, par une méta-analyse utilisant un modèle fixe d'effets positifs qui a démontré qu'un traitement aux statines, à fortes doses, réduisait le risque combiné d'infarctus du myocarde et de mortalité associés aux événements cardiovasculaires, de l'incidence ou du nombre d'événements cardiovasculaires et de mortalité associés à ces événements et d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Cannon, 2006) et aussi par une étude, sur des lapins transgéniques traités avec atorvastatine 2,5 mg / kg, qui a démontré qu'à cette forte dose la statine avait un effet antihypertrophique en plus de d'autres effets pléiotropiques (i.e anti-inflammatoire, antioxydant et sur la restauration du NO) (Senthil, 2005). La dose de 40 mg a également été utilisée afin de pouvoir éliminer la composante toxique secondaire au surdosage avec la dose de 80 mg. Donc, l'hypothèse de travail était que les effets pléiotropiques des statines pourraient contribuer à la restauration de la dysfonction endothéliale par leurs effets antioxydants, anti-inflammatoires, anticoagulants et de leur rôle dépendant de l'endothélium par la libération de cellules endothéliales progénitrices.

Résultats échocardiographiques

Le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche après 60 jours de cerclage aortique est démontré par des études échocardiographiques. Une augmentation significative de l'épaisseur du septum interventriculaire et de la paroi postérieure du ventricule gauche indique le développement de l'hypertrophie. Ces trouvailles sont confirmées par des mesures morphologiques qui démontrent une augmentation significative de la masse du ventricule gauche après 2 mois de surcharge de

pression et d'une augmentation significative de la masse du VG / masse corporelle, signe d'hypertrophie significative. Avec le développement de l'HVG induit par surcharge de pression après 60 jours de cerclage aortique, on retrouve une augmentation significative des pressions diastoliques et télé-diastoliques du ventricule gauche et une diminution du dP/dT de façon similaire aux paramètres échocardiographiques décrits dans des séries cliniques de patients avec HVG (Biegelsen, 1999).

Il est connu que le NO a un effet antihypertrophique sur le myocarde et sur les cellules musculaires lisses vasculaires (Schini-Kerth, 1995). Ce qui soulève la possibilité qu'une diminution de l'activité du NO dans ce modèle, suggéré par des diminutions significatives de la biodisponibilité et de la production du NO, peut promouvoir la progression d'HVG. La relâche paracrine de NO des cellules endothéliales de la microvasculature coronaire augmente la relaxation du myocarde et la fonction diastolique du ventricule gauche. Ce phénomène a été décrit par MacCarthy qui a démontré un impact direct sur la dysfonction endothéliale coronaire sur la fonction contractile du VG dans un modèle de porc de guinée (MacCarthy, 2000). Chez les humains avec hypertrophie sévère par surcharge de pression, une injection intrac coronaire de SNP, donneur exogène de NO, améliore la fonction diastolique en diminuant la pression télé-diastolique du VG (Vane, 1994). La diminution marquée de la relâche du NO des artères coronaires épicaudiques après 60 jours de cerclage aortique peut contribuer à l'altération globale de la fonction diastolique ventriculaire gauche observée dans ce modèle. Même si l'HVG est le mécanisme compensatoire initial, il est suivi ultimement par un déclin progressif de la fonction du VG et de l'insuffisance cardiaque (Grieve, 2001). Dans cette phase précoce d'HVG compensée, le travail du cœur reste normal tel que démontré par une fraction d'éjection d'environ 65 % comparé à 35% pour les patients insuffisants cardiaques. Dans ce modèle d'HVG, il n'y a pas d'augmentation de la pression systolique du VG, mais une diminution de dP/dT qui suggère une réduction de l'état contractile du VG (Tableau V).

	Basal	1 mois	2 mois
Pression systolique VG, mmHg	110,2 ± 7,3	108,2 ± 7,8	107,3 ± 9,6
Pression diastolique VG, mmHg	16,3 ± 3,6	7,9 ± 1,5*	23,0 ± 2,9*
Pression télé-diastolique VG, mmHg	16,7 ± 3,8	22,0 ± 2,9	32,7 ± 1,5*
Pression systolique IVA, mmHg	85,4 ± 11,9	92,7 ± 9,7	84,3 ± 9,8
Pression diastolique IVA, mmHg	52,0 ± 11,6	50,8 ± 6,2	35,0 ± 5,0
Pression systolique CX, mmHg	76,0 ± 9,4	91,7 ± 9,6	89,7 ± 6,2
Pression diastolique CX, mmHg	48,6 ± 7,6	50,7 ± 4,4	41,7 ± 1,7
Pression systolique CD, mmHg	91,4 ± 9,1	90,3 ± 11,8	91,3 ± 4,7
Pression diastolique CD, mmHg	62,8 ± 9,2	50,0 ± 8,0	48,3 ± 10,9
LV + dP, mmHg/s	1910,0 ± 303,9	1323,8 ± 374,1	1076,7 ± 90,6
LV- dT, mmHg/s	1980,0 ± 255,7	1265,8 ± 208,3*	1186,7 ± 150,6*

Tableau V. Tableau des résultats hémodynamiques représentant notre modèle expérimental établi depuis plus de 13 ans. Les données sont présentées comme moyenne ± SEM; VG : ventricule gauche, IVA : interventriculaire antérieure; CX : circonflexe : CD : coronaire droite * p<0,05 vs basal (Malo, 2003).

Ce modèle expérimental porcin d'HVG par surcharge de pression, résulte en une HVG compensée après 60 jours de cerclage aortique avec une diminution significative de la fonction diastolique du VG et en une préservation de la fonction systolique. La diminution de l'activité du NO peut être responsable des stades futurs d'HVG et du développement de l'insuffisance cardiaque. Le manque de changements significatifs des pressions coronariennes en la présence de ce cerclage aortique supra-valvulaire expérimental, élimine l'effet de changements pathologiques tels que la modification des forces de cisaillement, le patron du flot et le bas débit cardiaque comme cause de dysfonction endothéliale des coronaires épicaudiques et de la diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium. Donc, une surcharge chronique de pression est associée au développement d'une hypertrophie ventriculaire gauche significative avec dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques dans un modèle porcin ayant subi un cerclage aortique (Malo, 2003; Takemoto, 2001). En théorie, il est mentionné, dans la littérature, qu'un des effets pléiotropiques des statines est celui de limiter le développement de l'HVG par l'inhibition de la voie de signalisation de la protéine Ras. En effet, une étude dans un modèle de lapins transgéniques avec cardiomyopathie hypertrophique, a démontré qu'un traitement avec la simvastatine

renversait l'hypertrophie cardiaque et diminuait la fibrose (Patel, 2001). En effet, il a été démontré dans notre laboratoire qu'il y avait une augmentation de la fibrose interstitielle dans ce modèle d'HVG par surcharge de pression et que ce phénomène était probablement secondaire à l'augmentation de la formation d' O_2^- (Nakagami, 2003) et qu'un traitement avec le probucol (un antioxydant) diminuait de façon significative la fibrose interstitielle (Aubin, 2006). Dans notre étude, le développement de l'HVG après 60 jours de cerclage aortique a été analysé par études échocardiographiques telles que décrites précédemment. Ceux-ci n'étaient pas statistiquement différents et ceci démontre que dans notre modèle, l'utilisation d'atorvastatine 40 ou 80 mg dans un modèle préventif pour 60 jours ou dans un modèle interventionnel à partir de 60 jours pour 30 jours, ne renversait pas l'HVG associée à la dysfonction endothéliale. Il est connu que le monoxyde d'azote a un effet antihypertrophique sur le myocarde et sur les cellules musculaires lisses. Dans des conditions où le stress oxydant est augmenté, le NO est détruit par l' O_2^- , et donc moins disponible pour les cardiomyocytes (Folkers, 1995). En effet, il a été démontré dans notre laboratoire qu'une diminution de la biodisponibilité vasculaire du NO est associée à ce modèle d'HVG, tel que démontré par une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium des artères coronaires épigardiques (Malo, 2003). Cette dysfonction est accompagnée d'une augmentation des niveaux d'ONOO⁻ et est améliorée par l'administration exogène d'un analogue du BH₄ et des antioxydants, SOD et catalase (Malo, 2003¹). Ces observations impliquent qu'il y a une diminution de l'activité antioxydante endogène et/ou une augmentation des niveaux d'espèces oxygénées activées. Ceci soulève la possibilité que la diminution de la libération du NO, tel que démontré dans ce modèle peut favoriser la progression de l'HVG et que la statine n'est pas assez efficace pour limiter cet effet. Les données échocardiographiques observées dans ce projet démontrent ce que Malo avait trouvé antérieurement en ce qui concerne l'augmentation de l'épaisseur du septum interventriculaire et de la paroi postérieure du VG et de l'augmentation du gradient et de la vélocité maximale au site de cerclage de l'aorte ascendante. Cependant, il est intéressant de constater que l'on obtienne aussi des différences significatives entre les groupes avec un cerclage pour 60 jours versus 90 jours. Ceci

démontre bien le processus évolutif de l'hypertrophie ventriculaire gauche compensée avec dysfonction diastolique et fonction systolique préservée.

Les niveaux lipidiques

Les effets pléiotropiques des statines sont indépendants de la baisse de cholestérol. Ils incluent l'inhibition d'espèces oxygénées activées, de l'expression des molécules d'adhésion leucocytaires, des facteurs de croissance qui induisent la synthèse d'acide désoxyribonucléique, la production de macrophages, l'activation des lymphocytes T, l'expression des cytokines inflammatoires incluant le TNF- α , des interleukines, le ligand CD₄₀, de chimiokines et de la régulation à la hausse de la synthèse de NO (Rosenson, 2001).

Le fait qu'il n'y ait pas de différences significatives entre les groupes dans le bilan lipidique complet indique que tous nos résultats obtenus sont indépendants des niveaux de cholestérol. En théorie, une réduction de 1% des niveaux de cholestérol sanguin diminue les chances d'avoir un évènement coronarien de 1%. Ce facteur confondant est éliminé dans notre étude. Les effets pléiotropiques des statines doivent donc être évalués de façon indépendante des niveaux de cholestérol. Cette erreur se reproduit dans plusieurs études publiées dans la littérature et surtout chez celles avec des humains puisque les populations étudiées incluent les patients avec plusieurs comorbidités dont la dyslipidémie.

Contraction

Les contractions dépendantes et indépendantes de l'endothélium au KCl et à la PGF_{2 α} ne sont pas significativement différentes après 60 jours de constriction aortique. Ceci confirme l'intégrité de la fonction contractile des cellules musculaires lisses vasculaires des artères coronaires épocardiques et cela signifie que la sensibilité des vaisseaux aux agents contractiles est préservée dans cette situation pathologique. Aussi en évaluant la contraction maximale du vaisseau avec le KCl, 50% de la contraction maximale est connue et obtenue avec le PGF_{2 α} donc le potentiel de relaxation maximale est assuré vu l'alignement optimal des fibres d'actine et de myosine.

Les relaxations dépendantes de l'endothélium

La vasodilatation altérée, dépendante de l'endothélium, a été décrite dans les artères coronaires des patients avec hypertension et HVG et peut être la conséquence ou une cause d'une réduction de la réserve coronaire retrouvée lors d'HVG (MacCarthy, 2000). Cette réduction de la réserve coronaire rend le cœur hypertrophié plus vulnérable à l'ischémie (Kingsbury, 2000). Ce modèle expérimental d'HVG induit par la surcharge de pression est associé avec une diminution significative des relaxations dépendantes de l'endothélium suggérant la présence de dysfonction endothéliale (Grieve, 2001). Cette dysfonction implique les relaxations par les voies de signalisation des protéines G_i et G_q avec l'expression et la capacité préservée de la eNOS à relâcher du NO, mais avec une biodisponibilité réduite du NO et des niveaux plasmatiques de nitrates/nitrites. Donc, les altérations des voies de signalisation des cellules endothéliales impliquent préférentiellement les voies couplées aux protéines G_i tel que démontré par un déplacement vers la droite de la courbe concentration-réponse à la sérotonine (5-HT), un agoniste qui se lie aux récepteurs de 5-HT_{1D} à la surface des cellules endothéliales qui sont couplées aux protéines G_i (Chen, 1998). Les relaxations à la bradykinine, qui sont responsables des relaxations dépendantes en se liant à des récepteurs B₂ couplés aux protéines G_q , sont diminuées dans ce modèle d'HVG chez certains groupes (groupes HVG et sans HVG tx 80 mg pour 60 jours), tel que démontré par le déplacement vers la droite de la courbe concentration-réponse à la bradykinine. Cependant, l'activation de l'EDHF semblerait compenser et améliorer les relaxations des courbes concentrations-réponse à la bradykinine, car ce système est activé lors d'une altération de la voie NO/GMPc et donc lorsque la synthèse de NO est inhibée dans ces artères, l'EDHF a la capacité d'induire des relaxations pratiquement normales (Flavahan, 1990). Le facteur hyperpolarisant, dérivé de l'endothélium, est un facteur diffusible et différent du NO qui cause des relaxations dépendantes de l'endothélium par hyperpolarisation des cellules musculaires lisses, par un influx de potassium dans les canaux potassiques qui dépendent de l'ATP (Malo, 2003). Le rôle physiologique exact de l'EDHF n'est pas bien connu. La diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium à la sérotonine à des

concentrations de 40 et 80 mg chez tous les groupes et à la bradykinine chez 2 groupes, démontre que l'atorvastatine ne peut renverser, ni même prévenir, la dysfonction endothéliale dans ce modèle porcin. Au contraire, à l'opposé de ce qui est démontré dans la littérature, les voies de signalisation des protéines G_i et G_q ne semblent pas être améliorées par les effets pléiotropiques des statines.

Il est vrai cependant, que la création iatrogène d'une sténose aortique dans d'autres modèles, peut causer une érosion aigüe et la perte de cellules endothéliales au site du cerclage ce qui peut mener à la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium, si la magnitude de la dénudation est suffisante (Boulanger, 1997) puisque la régénération de l'endothélium n'a pas la même capacité de vasorelaxation que l'endothélium normal (Houghton, 1998). Une étude par O Malo, un chercheur de notre laboratoire, a démontré que la dysfonction endothéliale coronarienne, qui se développe avec l'HVG, n'est pas due à la destruction ou à la perte des cellules endothéliales (Malo, 2003; Setoguchi, 2001). Il a démontré qu'une dysfonction endothéliale coronaire précoce reflète une anomalie fonctionnelle de la voie de signalisation de la transduction et n'est pas la conséquence d'un cycle de dénudation-régénération secondaire au cerclage aortique de l'aorte ascendante (Malo, 2003). Cette preuve a été évoquée suite à des études sur l'aorte ascendante faite par ce même chercheur (Malo, 2003). Dans la présente étude, aucune différence significative dans les relaxations dépendantes de l'endothélium au donneur exogène de NO, le SNP, n'ont été observées. Ceci élimine donc la possibilité qu'une altération des cellules musculaires lisses soit la cause de la diminution des relaxations. L'invariabilité des valeurs de pD_2 indique également que la diminution de la relaxation des vaisseaux n'est pas une conséquence de la diminution de la sensibilité de ceux-ci, mais certainement une diminution des niveaux de NO relâché.

Niveaux de GMPc et de nitrates/nitrites plasmatiques

Il a été démontré, dans notre laboratoire dans des études antérieures, qu'une supplémentation in vitro en méthyltétrahydrobioptérine, un analogue du cofacteur de BH₄, améliorerait de façon significative les relaxations dépendantes de l'endothélium des artères coronaires épocardiques chez ce modèle porcin (Malo, 2003). Les peroxynitrites, produits en situation de stress oxydant, peuvent oxyder le BH₄, induisant ainsi un découplage fonctionnel de la eNOS. Ceci augmente le niveau de stress oxydant aux dépens du NO. Un traitement avec l'atorvastatine ne diminue pas la production de peroxynitrites, qui aurait préservé le BH₄ et ainsi le couplage fonctionnel de l'enzyme pour augmenter la production du NO. Le traitement ne favorise pas non plus l'expression de l'enzyme eNOS tel que mentionné dans la littérature, par l'inhibition de l'isoprénoloïde géranyl-géranyl-PP qui normalement empêche la libération de la eNOS. La diminution significative de GMPc chez les groupes traités avec atorvastatine 40 et 80 mg pour 60 jours et chez le groupe sans cerclage aortique et traité 60 jours avec atorvastatine 80 mg démontre que la diminution de NO est secondaire à la diminution de GMPc. Le monoxyde d'azote est produit en quantités indétectables par les neurones, les cellules endothéliales, les plaquettes et les neutrophiles en réponse à des stimuli homéostasiques. Ce NO est rapidement détruit et agit de façon paracrine afin de traduire les signaux cellulaires. NO interagit avec le groupe hème prosthétique de la guanylate cyclase, activant l'enzyme et menant à une augmentation des niveaux de GMPc. Le NO est aussi produit par d'autres cellules (macrophages, fibroblastes et hépatocytes) en concentrations micromolaires en réponse à des stimuli mitogéniques ou à l'inflammation. Dans ce cas, le rôle biologique concerne la défense contre un pathogène externe par toxicité oxydative. Ces niveaux très élevés mènent à la formation de peroxynitrite, à la destruction des groupements fer-sulfure, à la nitrolyse du thiol et à la nitrolyse des protéines des résidus tyrosines. Alors, la quantité de NO produite dans des systèmes biologiques différents peut varier par rapport à plusieurs ordres de magnitude et sa réactivité chimique subséquente est diverse. Les produits finaux du NO in vivo sont le nitrite (NO₂⁻) et le nitrate (NO₃⁻). La proportion relative de NO₂⁻ et de NO₃⁻ est variable et ne peut

pas être prédite avec certitude. Or, le meilleur indice de la production de NO est la somme de NO_2^- et de NO_3^- . La dysfonction endothéliale retrouvée dans notre modèle implique que la biodisponibilité du NO est réduite tel que démontré par la réduction des niveaux plasmatiques de nitrates/nitrites observée. Donc, ces résultats nous démontrent que les niveaux de nitrites sont réduits chez les groupes avec HVG comparé au groupe témoin tel que prévu. Cependant, on retrouve une différence significative entre le groupe sans cerclage et traité avec l'atorvastatine 80 mg comparé au témoin.

Niveaux plasmatiques d'angiotensine II

L'angiotensine II est un activateur puissant de la NADPH oxydase, même à des concentrations inférieures au point limite de celui, favorisant l'augmentation de la pression artérielle. Après un cerclage aortique dans un modèle de rats, le système rénine-angiotensine (RAS) est rapidement activé, agissant donc sur la NADPH oxydase et générant d'importants niveaux d' O_2^- (Bouloumié, 1997; Higuchi, 2007). On retrouve une augmentation des niveaux d'angiotensine II chez les groupes traités avec l'atorvastatine 80 mg du jour 60 à 90 jours. Le stress oxydant, principalement par l'action de l'anion superoxyde, joue un rôle majeur dans le développement de l'hypertrophie des cardiomyocytes tel que mentionné précédemment. En effet, des cultures de cardiomyocytes hypertrophiés de rats démontrent que l'hypertrophie est secondaire à la production augmentée d' O_2^- et de la NADPH oxydase. Dans notre étude, l'augmentation des niveaux d'ANG II nous indique que l'activité de la NADPH est préservée. C'est donc que l'effet antioxydant de cette statine ne peut être démontré dans notre projet au contraire de ce qui est mentionné dans la littérature. En effet, la statine inhibe l'isoprenoïde géranyl-géranyl-PP qui favorise la libération de NADPH. Les statines peuvent aussi bloquer les récepteurs AT_1 de façon indirecte par leur action sur les LDL-oxydés ou directement sur ce récepteur. Puisque les niveaux d'ANG II ne sont pas diminués par rapport aux contrôles, mais plutôt augmentés, cet effet n'est donc pas observé dans notre modèle.

Niveaux plasmatiques de protéines carbonyls

Les espèces oxygénées activées sont produites suite au métabolisme aérobie normal. Des radicaux libres très réactifs peuvent oxyder les lipides, les protéines, et l'ADN contribuant ainsi au développement d'une variété de maladies incluant l'artériosclérose, les maladies cardiovasculaires et les maladies inflammatoires. L'indicateur le plus général et de loin le plus commun des marqueurs de l'oxydation des protéines sont les protéines carbonyls. L'augmentation significative des niveaux de protéines carbonyls dans le groupe sans cerclage, mais traité avec l'atorvastatine 80 mg pour 60 jours et l'élévation des niveaux dans tous les groupes, mais de façon non significative, suggère que le processus oxydatif est présent dans ce modèle et que la statine n'a pas pu contrer cet effet.

Une revue de la littérature publiée dans le Lancet en 2007, qui incluait tous les articles publiés entre 1985 et 2006, a démontrée que les statines étaient sécuritaires, efficaces et ne comportaient que peu d'effets secondaires. Les plus fréquents sont les myopathies, la rhabdomyolyse et l'élévation des enzymes hépatiques. Cependant, ceux-ci ne surviennent que chez un patient sur 10 000 à doses standard et bien que les risques augmentent avec des doses plus élevées de statines, ils demeurent bas avec l'atorvastatine 80 mg. La rhabdomyolyse a été identifiée chez 17 % des porcs traités avec l'atorvastatine. Des niveaux de CK élevés d'environ 6000 unités ont été constatés suite à des dosages de cet enzyme avant d'euthanasier l'animal. Tout processus qui perturbe la production ou l'utilisation de l'ATP par le muscle strié squelettique ou qui impose une demande en énergie excédant les possibilités de production d'ATP peut provoquer une rhabdomyolyse. Dès la diminution des concentrations en ATP, les réactions consommatrices d'énergie et donc en premier lieu les mécanismes d'homéostasie cellulaire commencent à faiblir. De ce fait, la pompe Na-K ATPase-dépendante ne peut plus expulser le sodium du cytoplasme, entraînant l'accumulation de sodium et d'eau dans le myocyte, aboutissant à un œdème intracellulaire. La faillite des pompes ATPase-dépendantes entraîne une augmentation importante du calcium ionisé (Ca^{++}) dans le cytosol et

dans la mitochondrie. Cette augmentation intra-cytosolique du Ca^{++} est à l'origine d'un défaut de relaxation se traduisant cliniquement par des contractures ou des crampes. Il y a atteinte de l'intégrité cellulaire notamment par le biais des activations des protéases, mais aussi de la production non contrôlée de radicaux libres. Les troubles de perméabilité membranaire entraînent l'entrée massive de sel et d'eau dans la cellule aggravant l'étirement des cellules. Les muscles étant insérés dans des aponévroses peu extensibles, le développement de l'œdème s'accompagne d'une augmentation marquée de la pression interstitielle locale, comprimant les vaisseaux nourriciers et les nerfs. De plus, l'extravasation peut être suffisamment importante pour provoquer une hypovolémie. Quelle que soit l'étiologie, les troubles observés sont alors similaires. La production de radicaux libres et l'acidose locale aggravent les lésions membranaires qui, lorsqu'elles deviennent importantes, font que le contenu cellulaire se déverse dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme est favorisé par le phénomène de reperfusion (Kloner, 1989).

Un groupe de scientifiques s'est intéressé de façon plus objective aux études faites avec les statines. Ils ont conclu, que la majorité des études utilisant comme médicament une statine, étaient toutes commanditées par les compagnies pharmaceutiques produisant celui-ci. En effet, les études incluent de petites populations de sujets et sont produites à des fins commerciales. La majorité de celles-ci, analysaient seulement les niveaux lipidiques et non les effets pléiotropiques de ces statines. Bero et ses collègues affirment qu'il y a un biais évident dans ces études et ces résultats sont démontrés dans 192 études randomisées entre Janvier 1999 et Mai 2005 (Bero, 2007). Certains auteurs spéculent que les compagnies pharmaceutiques choisissent de façon délibérée de faibles doses pour la comparaison entre les médicaments. Cette tactique peut faire en sorte que les produits de la compagnie paraissent meilleurs dans les essais. Aussi, le fait que les essais défavorables aux statines n'étant pas publiés et étaient supprimés induit ainsi un biais de publication. Et finalement, plus du tiers des études de l'échantillon n'avaient pas dévoilé leurs commanditaires. Certaines études récentes rapportent que l'on retrouve, chez certaines populations de gens telles que les femmes de plus de 65 ans et les personnes de race noire, un déclin cognitif accéléré chez les patients

traités avec des statines (Szwast, 2007; Bernick, 2005). Pour la plupart, les statines sembleraient ralentir le déclin cognitif et certaines maladies telles l'Alzheimer. Cependant, il n'existe aucune certitude que cet effet est secondaire aux baisses de cholestérol ni à l'effet antioxydant des statines. Un exemple de cette réduction du statut mental est une étude de cas publiée par Padala qui démontre que la simvastatine était associée au déclin cognitif d'un homme de 64 ans qui avait baissé son pointage du mini-mental de 3 point et qu'après le retrait de la statine, celui-ci était revenu à son pointage normal. De plus, ils ont remarqué, à l'aide de tests neuropsychologiques que cet homme éprouvait des problèmes aigus avec sa mémoire à long et court terme et à sa capacité à se rappeler des noms de personnes et d'objets (Padala, 2006). Le mécanisme de ce phénomène est cependant encore inconnu.

Le profil d'innocuité des «*inhibiteurs de l'hydroxy-3 méthyl-3 glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase*» (statines) est très favorable. Avec la venue sur le marché de l'atorvastatine, qui est une statine beaucoup plus puissante, une tendance existe à augmenter les doses des autres statines, ce qui accentue les risques associés à leur utilisation. Un effet pharmacologique exagéré pourrait être à l'origine de certains des effets nocifs les plus importants des statines. Plus précisément, la diminution de la formation de l'acide mévalonique consécutive à l'inhibition de l'HMG-CoA réductase pourrait entraîner une baisse des niveaux d'ubiquinone. L'ubiquinone joue un rôle important dans la bioénergie mitochondriale et est le seul antioxydant liposoluble synthétisé *de novo*. L'ubiquinone est indispensable pour le bon fonctionnement cardiaque (Folkers, 1995; Langsjoen, 1988; Espoti, 1991). Les baisses des niveaux plasmatiques d'ubiquinone sont associées à plusieurs pathologies dont les cardiomyopathies, les hyperlipidémies (Kontush, 1997), les maladies musculaires dégénératives et la formation de carcinomes hépatocellulaires (Eggens, 1989). Des baisses d'ubiquinone ont été notées lors d'épisodes de rejet chez des patients ayant subi une transplantation cardiaque (Karlsson, 1997). Les effets secondaires des statines pourraient aussi s'expliquer par l'hypothèse de la sélénoprotéine. Les sélénoprotéines jouent un rôle majeur dans le métabolisme des

muscles squelettiques et cardiaques. Des niveaux insuffisants de cette protéine et une déficience en sélénium ont été associés aux myopathies. En inhibant la voie du mévalonate, les statines diminuent l'isopentényl-pyrophosphate, qui est requis pour l'activation de l'ARN transfert de la sélénocystéine. Or, les statines diminuent la production de sélénoprotéine, donc peuvent causer au moins théoriquement des myopathies cardiaques et squelettiques (Kumudha, 2008).

Une autre hypothèse qui explique les effets délétères des statines est celle de l'endotoxine-lipoprotéine. Même si une élévation des niveaux de cholestérol est considérée comme un facteur de risque de maladies cardiovasculaires, des niveaux trop bas peuvent aussi être associés à un mauvais pronostic chez les patients avec insuffisance cardiaque sévère. Lorsque les lipoprotéines plasmatiques sont abaissées, il y en a moins de disponible pour la liaison aux lipopolysaccharides aussi appelées endotoxines. Ce déficit mène à une plus grande production de TNF- α puisque les cellules inflammatoires répondent aux niveaux élevés d'endotoxines circulantes amenant ainsi une perméabilité vasculaire augmentée et une exacerbation de l'insuffisance cardiaque. Il aurait été intéressant de mesurer les niveaux de TNF- α dans notre modèle.

En résumé :

Bénéfices potentiels selon la littérature	Risques potentiels selon la littérature
↓ Artériosclérose	Risques des niveaux bas de CH
↓ Espèces oxygénées activées	↓ Coenzyme Q10/ubiquinone
↓ Inflammation	↓ de la clairance des endotoxines
↓ Hypertrophie	Polypharmacie non nécessaire
↑ Fonction endothéliale	↓ Sélénium/ sélénoprotéines
↑ Cellules endothéliales progénitrices	↑ Stress oxydant, dysfonction endothéliale, Ang II (selon ce projet)

Tableau VI : Tableau représentant les bénéfices et risques potentiels de l'utilisation des statines.

CONCLUSION

L'endothélium joue un rôle important dans le maintien du tonus et de l'intégrité vasculaire, surtout par la synthèse et la libération du NO. L'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium est un marqueur de la dysfonction endothéliale qui peut affecter grandement la fonction des organes cibles. Ainsi, les anomalies de la fonction endothéliale contribuent à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires. Le grand nombre d'études disponibles et la disparité des résultats soulignent la complexité des mécanismes physiopathologiques responsables de l'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. L'hypertrophie ventriculaire gauche secondaire à un cerclage aortique résulte en une diminution de la biodisponibilité du NO, de l'augmentation du stress oxydant et finalement, de l'altération des relaxations dépendantes de l'endothélium des artères coronaires épicaudiques porcines. Les résultats obtenus dans notre étude, démontrent que les effets pléiotropiques des statines ne sont pas bénéfiques sur la restauration de la dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques associée à l'HVG dans un modèle porcin. En effet, la persistance du stress oxydant et de la dysfonction endothéliale, expliquée par la diminution de la biodisponibilité du NO, prouve que l'utilisation des statines pour leurs effets pléiotropiques doit être étudiée de façon stricte malgré que des indications aient été prouvées dans des essais randomisés publiés dans la littérature. Donc, les statines ont démontré leur efficacité comme agents hypolipidémians, cependant prudence s'impose en ce qui a trait à leur sécurité, tolérance et finalement de leur utilisation comme agents prophylactiques chez des sujets sains.

Perspectives sur la recherche

Son indication comme traitement hypolipidémiant est fortement recommandée, mais d'autres études fondamentales devraient être faites et devraient évaluer l'effet de ces statines sur d'autres lits vasculaires. D'autres marqueurs devraient être analysés dans un projet comme celui-ci tels les métalloprotéinases 9 et 11, car il semblerait que ces enzymes pourraient être activées par l'atorvastatine et les autres

marqueurs de stress oxydant comme la protéine C-réactive et le TNF- α et ceux dépendant de l'endothélium tel l'ET-1.

De plus, il serait intéressant de mesurer les niveaux d'ubiquinone chez les humains traités avec l'atorvastatine afin de voir si cette réduction est significative et si elle pourrait même être précurseur du développement de pathologies associés à cette baisse dont les cardiomyopathies, les hyperlipidémies (Kontush et al, 1997), les maladies musculaires dégénératives et la formation de carcinomes hépatocellulaires (Eggens et al, 1989). De plus, des études de réactivité vasculaire devraient être faites sur d'autres lits vasculaires comme les artères cérébrales, ainsi que des études in vivo sur les lits vasculaires coronariens et rénaux. En effet, des projets en cours, comme celui d'une équipe de l'Université Laval à Québec, suggèrent l'augmentation de la dysfonction endothéliale des artères rénales ainsi que de la tension artérielle chez des porcs traités avec atorvastatine à forte dose, et des études déjà publiées comme celui de Szwasz et Bernick sur le déclin cognitif retrouvé chez certaines populations rapportent des résultats inquiétants et non négligeables.

De plus, des études non commanditées et faites de façon aléatoire devraient évaluer de façon plus approfondie les effets secondaires à long terme des statines chez les humains.

Limitations du modèle

Une limite de ce modèle est que notre technique de cerclage aortique n'expose pas les artères aux mêmes forces de cisaillement qu'une sténose aortique valvulaire. Néanmoins, il n'y a aucune évidence de dysfonction endothéliale à court terme due à une modification du flot intracoronarien secondaire à une sténose supraostiale. Aussi, la courte durée de ce projet est opportun pour caractériser les altérations des voies de signalisation de la transduction des cellules endothéliales, mais s'applique uniquement à l'hypertrophie ventriculaire gauche compensée. Cette courte période de temps utilisée dans ce modèle, tel que mentionné précédemment, est un inconvénient pour l'étude des mécanismes, mais des expériences chroniques pourraient être très utiles dans la caractérisation de la cinétique de la dysfonction

endothéliale à plus long terme dans un modèle de surcharge de pression. Pour des études à long terme, l'utilisation de porcs miniatures serait un atout puisqu'il n'y aurait pas de problème au niveau de la croissance normale des porcs.

SOURCES DOCUMENTAIRES

Albers JJ, Marcovina SM, Kennedy H. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. II. Evaluation and selection of candidate reference materials *Clin Chem*. 1992 May; 38(5): 658-62.

Ali ZA, Lim E, Motalleb-Zadeh R, Ali AA, Callaghan CJ, Gerrard C, Vuylsteke A, Foweraker J, Tsui S. Allogenic blood transfusion does not predispose to infection after cardiac surgery *Ann Thorac Surg*. 2004 Nov; 78(5):1542-6.

Almuti K, Rimawi R, Spevack D, Ostfeld RJ. Effects of statins beyond lipid lowering: Potential for clinical benefits *Intern J of Cardiol* 2006; 109: 7-15.

Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med*. 1995; 332: 488-93.

Andries LJ, Brutsaert DL, Sys SU. Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. *Circ Res*. 1998; 82: 195-203.

Aoki H, Izumo S, Sadoshima J. Angiotensin II activates RhoA in cardiac myocytes: a critical role of RhoA in angiotensin II-induced premyofibril formation *Circ Res*. 1998 Apr 6; 82(6): 666-76.

Arimura K, Egashira K, Nakamura R, Ide T, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280: H68-75.

Aubin MC, Carrier M, Shi YF, Tardif JC, Perrault LP. Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 46: 702-710.

Baldwin AL, Thurston G. Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Crit Rev Biomed Eng* 2001; 29:247-278.

Ball SG, Hall AS, Murray GD. ACE inhibition, atherosclerosis and myocardial infarction--the AIRE Study in practice. Acute Infarction Ramipril Efficacy Study *Eur Heart J.* 1994 May; 15 Suppl B:20-5.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:1620-4.

Beucler I, Caces E, Camare R, Dachet C, Fruchart JC, Gambert P, Girault A, Leglise D, Legrand A, Mainard F, et al. Use of 6 serum pools in standardization of the determination of apolipoproteins AI and B in the human serum *Ann Biol Clin (Paris).* 1990; 48(7): 443-7.

Berk BC, Vallega G, Muslin AJ, Gordon HM, Canessa M, Alexander RW. Spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells in culture exhibit increased growth and Na^+/H^+ exchange *J Clin Invest.* 1989 Mar; 83(3):822-9.

Bernick C, Katz R, Smith NL, Rapp S, Bhadelia R, Carlson M, Kuller L Statins and cognitive function in the elderly: the Cardiovascular Health Study *Neurology.* 2005; 65(9): 1388-94.

Bero L, Oostvogel F, Bacchetti P, Lee K. Factors associated with findings of published trials of drug-drug comparisons: Why some statins appear more efficacious than others. *PloS Med* 2007; 4: e184.

Bickel C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, et al. Influence of HMG-CoA reductase inhibitors on markers of coagulation, systemic inflammation and soluble cell adhesion. *Int J Cardiol* 2002; 82(1): 25-31

Biegelsen Elizabeth S, Loscalzo Joseph Endothelial function and atherosclerosis *Coronary Artery Disease* 1999;10:241-256

Blann AD, Maxwell SR, Burrows G, Miller JP. Antioxidants, von Willebrand factor and endothelial cell injury in hypercholesterolaemia and vascular disease *Atherosclerosis*. 1995 Aug; 116 (2):191-8.

Bloch KD, Janssens S. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3: impact on left ventricular function and myocardial infarction *Trends Cardiovasc Med*. 2005 Oct; 15(7):249-53. Review.

Block ER, Patel JM, Edwards D. Mechanism of hypoxic injury to pulmonary artery endothelial cell plasma membranes. *Am J Physiol*. 1989; 257:C223-31.

Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction. A marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:168-75.

Bonetti PO, Wilson SH, Rodriguez-Porcel M, Holmes DR Jr, Lerman LO, Lerman A

Simvastatin preserves myocardial perfusion and coronary microvascular permeability in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering *J Am Coll Cardiol*. 2002 Aug 7; 40(3):546-54.

Boulanger CL, Tanner FC, Bea ML, Werner A, Hahn AWA, Lüscher TF. Oxidized low density proteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res*. 1992; 70:1191-7.

Boulanger CM et PM Vanhoutte. G protein and endothelium-dependent relaxations. *J Vasc Res.* 1997; 34:175-185.

Bouloumié A, Bauersachs J, Linz W, Schölkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension* 1997; 30:934-41.

Boodhwani M, Mieno S, Feng J, Sodha NR, Clements RT, Xu SH, Selke FW. Atorvastatin impairs the myocardial angiogenic response to chronic ischemia in normocholesterolemic swine *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008 Jan;135(1):117-22.

Boodhwani M, Mieno S, Voisine P, Feng J, Sodha NR, , Li J, Selke FW. High-dose atorvastatine is associated with impaired angiogenesis in response to vascular endothelial growth factor in hypercholesterolemic swine *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006 132(6): 1299-306.

Bourcier T, Libby P. HMG-CoA reductase inhibitors reduces plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 556-62

Braunwald E. Pathophysiology of heart failure. Heart diseases: a textbook of Cardiovascular Medicine.1997 Saunders Edition. Volume 1: 886p.

Britten MB, Zeiher AM, Schächinger V. Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. *J Intern Med.* 1999; 245: 315-27.

Burton GW et KU Ingold. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci.* 1989; 570: 7-22.

Cai H et DG Harrison. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87: 840-4.

Cai H, Griendling KK, Harrsion DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *TRENDS in Pharmacological sciences.* 2003; 24(9): 471-8.

Calabrò P, Yeh ETH. The pleiotropic effects of statins *Curr Opin Cardiol* 2005; 20: 541-546.

Caldwell PR, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. Angiotensin-converting enzyme: Vascular endothelial localization. *Science.* 1976; 191: 1050-1.

Campbell WB et KM Gauthier. What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors? *Curr Opin Nephrol Hypertens Res.* 2002; 11:177-83.

Campeau L, Enjalbert M, Lespérance J, Vaislic C, Grondin CM, Bourassa MG. Atherosclerosis and late closure of aortocoronary saphenous vein grafts:sequential angiographic studies at 2 weeks, 1 year, 5-7 years, and 10-12 years after surgery *Circulation* 1983;68:II1-7

Cannon CP, Benjamin A, Steinberg BA, Murphy MPH, Mega JL, Braunwald E. Meta-Analysis of Cardiovascular Outcomes Trials Comparing Intensive Versus Moderate Statin Therapy *Journal of American College of Cardiology* 2006; 48: 438-45.

Cannon R. Role of nitric oxide en cardiovascular disease: focus on endothelium. *Clin Chem* 1998; 44: 1808-1819.

Cappola TP, Kass DA, Nelson GS, Berger RD, Rosas GO, Kobeissi ZA, Marbán E, Hare JM. Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001 Nov 13; 104(20): 2407-11.

Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension*. 1997; 30: 57-63.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998 Nov 13; 282(5392): 1318-21

Castelli WP. The triglyceride issue: a view from Framingham *Am Heart J*. 1986 Aug;112 (2): 432-7.

Castellot JJ Junior Heparan sulfates: physiologic regulators of smooth muscle cell proliferation? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990 Jan; 2(1): 11-2. Review.

Chen TH, Tseng HP, Yang JY, Mao SL. Effects of antioxidant in endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoproteins. *Life Sci*. 1998; 62: 277-82.

Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptative physiologic response. *FASEB J*. 1991; 5: 3037-46.

Chung MK, Martin DO, Sprecher D, et al. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias. *Circulation* 2001; 104: 2886-91.

Collins, R. Peto, S. MacMahon, P. Hebert, N.H. Fiebach, K.A. Eberlein, J. Godwin, N. Qizilbash, J.O. Taylor and C.H. Hennekens, Blood pressure, stroke and coronary heart disease, part II: effects of short-term reductions in blood pressure. An overview of the unconfounded randomized drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990; 335: 827–838.

Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease *Clin Chim Acta*. 2006 Jun; 368(1-2): 33-47.

Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northbridge DB, Boon NA, Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression (SALTIRE) Investigators A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2005 Jun 9; 352(23): 2389-97.

Desjardins F, Aubin MC, Perrault LP. Decrease of endothelin receptor subtype ET_B and release of COX-derived products contribute to endothelial dysfunction in porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005; 6: 499-508.

Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway *J Clin Invest*. 2001; Aug; 108 (3): 391-7.

Dulak J, Loboda A, Jazwa A, Zagorska A. Atorvastatin Affects Several Angiogenic Mediators in Human Endothelial Cells *Endothelium* 2005; 12: 233-241.

Eggens I, Elmberger PG, Löw P. Polyisoprenoid, cholesterol and ubiquinone levels in human hepatocellular carcinomas *Br J Exp Pathol*. 1989 Feb; 70(1):83-92.

Eldor A, Falcone DJ, Hajjar DP, Minick CR, Weksler BB. Recovery of prostacyclin production by de-endothelialized rabbit aorta. Critical role of neointimal smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1981 Mar; 67(3): 735-41.

Endres Matthias and Laufs Ulrich Effects of Statins on Endothelium and Signaling Mechanisms *Stroke* 2004; 35(Suppl I): 2708-2711.

Ercan E, Tengiz I, Altuglu I, Sekuri C, Aliyev E, Ercan HE, Akin M. Atorvastatin treatment decreases inflammatory and proteolytic activity in patients with hypercholesterolemia *Kardiol Pol.* 2004 May; 60(5):454-8.

Esper Ricardo J, Nordaby Roberto A, Vilarino Jorge O, Paragano Antonio, Cacharron José L, Machado Rogelio A. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal *Cardiovascular Diabetology* 2006; 5: 4

Esposti MD, Lenaz G. The kinetic mechanism of ubiquinol: cytochrome c reductase at steady state *Arch Biochem Biophys.* 1991 Sep; 289(2):303-12.

Eto M, Kozai T, Cosentino F, et al. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002; 105 (15): 1756-9

Evans JM, Donnan PT, Morris AD. Adherence to oral hypoglycaemic agents prior to insulin therapy in Type 2 diabetes *Diabet Med.* 2002; Aug; 19 (8): 685-8.

Fabian E, Varga A, Picano E, Vajo Z, Ronaszeki A, Csanàdy M. Effects of simvastatin on endothelial fuction in cardiac syndrome patients *Am J Cardiol* 2004; 94(5): 652-5.

Farzaneh –Far A, Libby P, Singh D. Pravastatin, simvastatin and atorvastatin appear equally effective for preventing cardiovascular events *Evidence-based Cardiovasc Medicine* 2006; 10:1 35-137.

Favier A. Oxidative stress: value of its demonstration in medical biology and problems posed by the choice of a marker *Ann Biol Clin (Paris)*. 1997; Jan-Feb; 55(1): 9-16. Review.

Fedson DS, Pandemic influenza: a potential role for statins in treatment and prophylaxis *Clin Infect Dis* 2006; 43(2): 1999-205.

Feener EP, Northrup JM, Aiello LP, King GL. Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1995 Mar; 95(3): 1353-62.

Féléto M et PM Vanhoutte. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996; 23: 1082-90.

Feron O, Desy C, Desager JP, Balligand JL. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation*. 2001; 103: 113-8.

Fiorucci S, Mencarelli A, Meneguzzi A, Lechi A, Morelli A, del Soldato P, Minuz P. NCX-4016 (NO-aspirin) inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in vivo: role of nitric oxide *Circulation*. 2002; Dec 10;106(24): 3120-5.

Flavahan NA, Vanhoutte PM. G-proteins and endothelial responses. *Blood Vessels*. 1990; 27: 218-229.

Flavahan NA et PM Vanhoutte. Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. *Am J Hypertens*. 1995; 8: 28S-41S.

Flowers MA, Wang Y, Stewart RJ, et al. Reciprocal regulation of endothelin-1 and endothelial constitutive NOS in proliferating endothelial cells *Am J Physiol* 1995; 269 (6): H1988-97

Folkers K, Simonsen R. Two successful double-blind trials with coenzyme Q10 (vitamin Q10) on muscular dystrophies and neurogenic atrophies *Biochim Biophys Acta*. 1995 May 24;1271 (1):281-6.

Ford ES. Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults *Epidemiology*. 2002 Sep;13(5): 561-8.

Forrester JS, Libby P. The Inflammation Hypothesis and Its Potential Relevance to Statin Therapy *Am J Cardiol* 2007; 99: 732-738.

Frick M, Dulak J, Cisowski J, Jozkowicz A, Zwick R, Alber H, Dichtl W, Schwarzacher SP, Pachinger O, Weidinger F. Statins differentially regulate vascular endothelial growth factor synthesis in endothelial and vascular smooth muscle cells *Atherosclerosis* 2003;170(2): 229-36.

Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*. 1986 May 15; 247(1): 1-11. Review.

Furchgott RF Endothelium-Derived Relaxing Factor: Discovery, Early Studies, and Identification as Nitric Oxide *Bioscience reports*. 1999; 19(4): 235-333.

Furchgott RF et JV Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-6.

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells *J Clin Invest*. 1989 May; 83(5):1774-7.

Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*. 2005 Mar; 115(3): 500-8. Review.

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway *Nature*. 1990 Feb 1; 343(6257): 425-30. Review.

Grieve DJ, MacCarthy PA, Gall NP, Cave AC, Shah AM. Divergent biological actions of coronary endothelial nitric oxide during progression of cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2001; 38: 267-273.

Grosser N, Schroder H. A common pathway for nitric oxide release from NO-aspirin and glyceryl trinitrate *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jul 21; 274(1): 255-8.

Guerra S, Brotherton A.F.A., Goodwin P.J., Clark C.R., Armstrong M.L and Harrison D.G., Mechanisms of abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in atherosclerosis: implications for altered autocrine and paracrine functions of EDRF. *Blood Vessels* 1989; 26: 300–314.

Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, eleventh edition, Elsevier Saunders, 2006

Haller H Modulation of endothelial function: strategy for long-term cardiovascular protection. *J Hypertens* 1996; 14: S27–S32.

Halushka PV, Mais DE, Morinelli TA. Thromboxane and prostacyclin receptors
Prog Clin Biol Res. 1989; 301: 21-8. Review.

Harrison DG, Cai H, Landmesser U, Griendling KK. Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2003; 4: 51-61.

Hassan HM. Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med.* 1988; 5(5-6): 377-85. Review.

Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 101: 2711-9.

Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology *Clin Sci (Lond).* 2007 Apr; 112(8): 417-28. Review.

Hill MF, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction *Circulation.* 1997 Oct 7; 96(7): 2414-20.

Hink U, Tsilimingas N, Wendt M, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus: therapeutic implications *Treat Endocrinol.* 2003; 2(5): 293-304. Review.

Hirata Y, Itoh K, Ando K, Endo M, Marumo F. Plasma endothelin levels during surgery *N Engl J Med.* 1989 Dec 14; 321(24): 1686.

Hwang J, Saha A, Boo YC, Sorescu GP, McNally JS, Holland SM, Dikalov S, Giddens DP, Griendling KK, Harrison DG, Jo H. Oscillatory shear stress stimulates endothelial production of O₂⁻ from p47phox-dependent NAD(P)H oxidases, leading to monocyte adhesion *J Biol Chem.* 2003 Nov 21; 278(47): 47291-8

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Takeshita A. Amiodarone protects cardiac myocytes against oxidative injury by its free radical scavenging action. *Circulation.* 1999 Aug 17; 100(7): 690-2.

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, et al Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical *Circ Res* 1987; 61: 866-879.

Imran MB, Yousuf M. Standardization of the techniques evaluating endothelial functions *J Coll Physicians Surg Pak.* 2003 Feb; 13(2): 121-4. Review.

Imtiaz S, Karen J. Preoperative statin use and outcomes following cardiac surgery *International Journal of Cardiology* 2005; 103: 12-18.

Itoh H, Hattori Y, Sakamoto H, Ishii H, Kishi T, Sasaki H, Yoshida T, Kono M, Sugimura T, Terada M. Preferential alternative splicing in cancer generates a K-sam messenger RNA with higher transforming activity. *Cancer Res.* 1994; Jun 15;54(12):3237-41.

Jadot G, Toumi M, Courtiere A, Valli M, Razzouk H. Antioxidant enzymes in asthmatic patients. *Bull Acad Natl Med.* 1988 May;172(5): 693-700.

Jialal I, Grundy SM. Preservation of the endogenous antioxidants in low density lipoprotein by ascorbate but not probucol during oxidative modification *J Clin Invest.* 1991 Feb; 87(2): 597-601.

Jialal I, Stein D, Balis D, et al. Effect of hydroxymethyl glutaryl CoA reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation* 2001; 103: 1933-5

Jensen LO, Thayssen P, Pedersen KE, Haghfelt T. Short-and long-term influence of diet and simvastatin on brachial artery endothelial function *International Journal of Cardiology* 2006; 107: 101-106

Jensen LO, Thayssen P, Pedersen KE, Stender S, Haghfelt T. Regression of coronary atherosclerosis by simvastatin: a serial intravascular ultrasound study *Circulation.* 2004; Jul 20; 110(3): 265-70.

Kakuta T, Currier JW, Haudenschild CC, Ryan TJ, Faxon DP. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation.* 1994 Jun; 89 (6):2809-15.

Kannel W.B, A.L. Dauenberg and D. Levy, Population implications of electrocardiographic left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol.* 1987; 60:851–931.

Karalis DG, Ross AM, Vacari RM, Zarren H, Scott R. Comparison of efficacy and safety of *atorvastatin* and *simvastatin* in patients with dyslipidemia with and without heart disease *Am J Cardiol* 2001; 89(6): 667-671.

Karlsson J, Semb B. Heart muscle and plasma vitamin Q with heart transplantation. *Can J Cardiol.* 1997 Feb;13 (2):147-52.

Karpe F, Bell M, Bjorkegren J, Hamsten A. Quantification of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy men by retinyl ester labeling and simultaneous measurement of apolipoproteins B-48 and B-100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Feb; 15(2): 199-207.

Kharbanda RK, Wallace S, Walton B, Donald A, Cross JM, Deanfield J. Systemic Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibition reduces inflammation and improves vascular function in hypercholesterolemia. *Circulation.* 2005 Feb 15; 111(6): 804-7

Kimura M, Kurose I, Russel J, et al. Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1521-6

Kinlay S et P Ganz. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol.* 1997; 86(Suppl. III): III-12—III-19.

Kinlay S, Timms T, Clark M, Karam C, Bilodeau T, Ridker P, Rifai N, Carlson W, Lloyd- Jones, Johnstone, M, Rubenstein J, Alexander S, Orav J, Stone P. Comparaison of effect of intensive lipid lowering with atorvastatin to less intensive lowering with lovastatin on C-reactive protein in patients with stable angina pectoris and inducible myocardial ischemia *The American Journal of cardiology* 2002; 89: 1205-1207.

Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation.* 1989 Nov; 80(5):1115-27.

Kontush A, Reich A, Baum K, Spranger T, Finckh B, Kohlschütter A, Beisiegel U. Plasma ubiquinol-10 is decreased in patients with hyperlipidaemia *Atherosclerosis*. 1997 Feb 28; 129(1):119-26.

Kukovetz WR, Holzmann S, Wurm A, Poch G. Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. *J Cyclic Nucleotide Res*. 1979 Dec; 5(6):469-76.

Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals *Nat Med*. 2000 Sep; 6(9):1004-10

Landmesser Ulf, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, Spiekermann S, Hilfiker-Kleiner D, Templin C, Kotlarz D, Mueller M, Fuchs M, Hornig B, Haller H, Drexler H. Statin-Induced Improvement of Endothelial Progenitor Cell Mobilization, Myocardial Neovascularisation, Left Ventricular Function, and Survival After Experimental Myocardial Infarction Requires Endothelial Nitric Oxide Synthase *Circulation* 2004; 110: 1933-1939.

Landmesser U, Harrison DG. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot *Circulation*. 2001 Nov 27; 104(22): 2638-40.

Lange H, Suryapranata H, De Luca G, Borner C, Dille J, Kallmayer K, Pasalary MN, Scherer E, Dambrink JH. Folate therapy and in-stent restenosis after coronary stenting *N Engl J Med*. 2004 Jun 24; 350(26): 2673-81.

Langsjoen PH, Folkers K, Lyson K, Muratsu K, Lyson T, Langsjoen P. Effective and safe therapy with coenzyme Q10 for cardiomyopathy *Klin Wochenschr.* 1988 Jul 1; 66(13):583-90.

Laplante MA, de Champlain J. The interrelation of the angiotensin and endothelin systems on the modulation of NAD(P)H oxidase *Can J Physiol Pharmacol.* 2006 Jan; 84(1): 21-8. Review.

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension *Circulation.* 1997 Feb 4; 95(3): 588-93.

Lembo G, Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac growth and hypertrophy. Recent advances and prospects for growth factor therapy *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Mar 27; 752: 115-27. Review

Liao JK. Beyond lipid lowering:the role of statins in vascular protection *Inter J Cardiol* 2002; 86: 5-18.

Lindroos M, Kupari M, Valvanne J, Strandberg T, Heikkila J, Tilvis R. Factors associated with calcific aortic valve degeneration in the elderly *Eur Heart J.* 1994 Jul; 15(7): 865-70.

Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins Inhibit Secretion of Metalloproteinase-1-2-3, and-9 From Vascular Smooth Muscle Cells and Macrophages *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 769-775.

Lüscher TF et PM Vanhoutte. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1986; 8: 344-8.

Lüscher TF et G Noll. Endothelial dysfunction in the coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994 ; 24 (Suppl. 3): S16-S26.

Lüscher TF, Oemar BS, Boulanger CM, Hahn AWA. Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors. In Lindpainter K. Ganten D (eds). *Molecular Reviews in Cardiovascular Medecine. London*. Chapman & Hall, 1996: 96-104.

Lüscher TF and M Barton. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*. 1997; 20(11 Suppl 2): II3-10.

MacCarthy PA et AM Shah. Impaired endothelium-dependent regulation of ventricular relaxation in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Circulation*. 2000; 101: 1854-60.

MacCarthy PA, Grieve DJ, Li JM, Dunster C, Kelly FJ, Shah AM. Impaired endothelial regulation of ventricular relaxation in cardiac hypertrophy. Role of reactive oxygen species and NADPH oxidase. *Circulation*. 2001; 104: 2967-74.

Macclouf J, Folco G, Patrono C. Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost* 1998; 79: 691-705.

MacMahon S, Peto R, Cutler Jr, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, A.Dyer A and Stamler J Blood pressure, stroke, and coronary heart disease, part I: effects of prolonged differences in blood pressure. Evidence from nine prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990; 335: 765–774.

Malo O, Carrier M, Shi YF, Tardif JC, Tanguay JF, Perrault LP. Specific alterations of endothelial signal transduction pathways of porcine epicardial coronary arteries in left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003 ; 42 : 275-86.

Malo O¹, Desjardins F, Tanguay JF, Tardif JC, Carrier M, Perrault LP. Tetrahydrobiopterin and antioxidants reverse the coronary endothelial dysfunction associated with left ventricular hypertrophy in a porcine model. *Cardiovasc Res.* 2003; 59: 501-11.

Maltese WA, Sheridan KM, Repko EM, Erdman RA. Post-translational modification of low molecular mass GTP-binding proteins by isoprenoid *J Biol Chem.* 1990 Feb 5; 65(4): 2148-55.

Mancini GBJ., Etminan M, Zhang B, Lévesque LE, FitzGerald M, Brophy JM, Reduction of morbidity and Mortality by Statins, Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, and Angiotensin Receptor Blockers in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 2554-60.

Mann KG Thrombosis: theoretical considerations. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1657S-1664S

Marban E, Koretsune Y. Cell calcium, oncogenes, and hypertrophy *Hypertension.* 1990 Jun15 (6 Pt 1): 652-8. Review.

Marcum JA, McKenney JB, Rosenberg RD. Anticoagulant active heparin-like molecules from vascular tissue. *Biochemistry* 1984; 23: 1730-1737.

Mark A.L, F.M. Abboud, P.G. Schmid and D.D. Heistad, Reflex vascular response to left ventricular outflow obstruction and activation of ventricular baroreceptors in dogs. *J Clin Invest* 2 1973: 1147–1153.

Marsden PA, Brenner BM. Nitric oxide and endothelins: novel autocrine/paracrine regulators of the circulation. *Semin Nephrol.* 1991 Mar;11(2): 169-85. Review.

Marz P. Otten U, Miserez A. Statins induce differentiation and cell death in neurons and astroglia *Glia* 2007; 55(1): 1-12.

Masaaki li et Losordo Douglas W. Statins and the endothelium. *Vascular Pharmacology* 2007; 46(1): 1-9.

Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial relaxation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 235-55.

Mason JC, Ahmed Z, Mankoff R, Lidington EA, Ahmad S, Bhatia V, Kinderlerer A, Randi AM, Haskard DO. Statin-Induced Expression of Decay-Accelerating Factor Protects Vascular Endothelium Against Complement-Mediated Injury *Circ Res* 2002; 91: 696.

Mason RP, Walter MF, Jacob RF. Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors on Endothelial Function. Role of Microdomains and Oxidative Stress *Circulation* 2004; 109:1 1-34.

Matsunaga T, Weihrauch DW, Moniz MC, Tessmer J, Warltier DC, Chilian WM. Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide *Circulation*. 2002 May 7; 105(18): 2185-91.

Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood*. 1981 May; 57(5): 946-55.

Mende U, Kagen A, Cohen A, Aramburu J, Schoen FJ, Neer EJ. Transient cardiac expression of constitutively active G alpha q leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13893-8.

Merla R, Dahler IN, Ye Y, Uretsky BF, Birnbaum Y. Pretreatment with statins may reduce cardiovascular morbidity and mortality after elective surgery and percutaneous coronary intervention: clinical evidence and possible underlying mechanisms *Am Heart J* 2007;154:391-402.

Michel T, Smith TW. Nitric oxide synthases and cardiovascular signaling. *Am J Cardiol*. 1993 Sep 9; 72(8): 33C-38C. Review.

Molavi B, Mehta JL. Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations *Curr Opin Cardiol*. 2004 Sep; 19(5): 488-93. Review.

Mombouli JV et PM Vanhoutte. Purinergic endothelium-dependent and – independent contractions in rat aorta. *Hypertension*. 1993; 22: 577-83.

Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial Dysfunction: From Physiology to Therapy *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 61-74.

Moncada S, Vane JR. Prostacyclin: homeostatic regulator or biological curiosity? *Clin Sci (Lond)*. 1981 Oct; 61(4): 369-72. Review.

Mozaffarian D, Minami E, Letterer RA, Lawler RL, McDonald GB, Levy WC. The effects of *Atorvastatin* (10 mg) on Systemic Inflammation in Heart Failure *Am J Cardiol* 2005; 96: 1699-1704.

Nair C, Colburn H, McLean D, Petrasovits A. Cardiovascular disease in Canada *Health Rep*. 1989;1(1):1-22.

Nakagami H, Takemoto M, Liao JK NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Jul;35(7):851-9.

Nakashima M, Vanhoutte PM. Age-dependent decrease in endothelium-dependent hyperpolarizations to endothelin-3 in the rat mesenteric artery *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 22 Suppl 8: S352-4.

Nicholas A, Flavahan and Paul M. Vanhoutte. Endothelial Cell Signaling and Endothelial Dysfunction. *Am J Hypertens* 1995; 8: 28S-41S

Nicholls SJ, Tuzcu M, Schoenhagen P, Sipahi I, Crowe T, Kapadia S, Nissen SE. Effect of *Atorvastatin* (80mg/day) Versus *Pravastatin*(40mg/day) on arterial Remodeling at Coronary Branch Points (from the REVERSAL Study) *Am J Cardiol* 2005; 96: 1636-1639.

Okada Y, Katsuda S, Okada Y, Nakanishi I. An elastinolytic enzyme detected in the culture medium of human arterial smooth muscle cells. *Cell Biol Int*. 1993 Sep; 17(9): 863-9.

Ong HT. Evidence-Based Prescribing of Statins: A developing World Perspective *PLOS* 2006; 3:3.

Ozaydin M, Varol E, Suleyman M. A., Kucuktepe Z, Dogan A, Ozturk M, Altinbas A. Effect of *Atorvastatin* on the Recurrence Rates of Atrial Fibrillation after Electrical Cardioversion. *Am J Cardiol* 2006; 97: 1490-1493.

Padala KP, Padala PR, Potter JF. Simvastatin-induced decline in cognition. *Ann Pharmacother.* 2006 Oct; 40(10):1880-3.

Paraskevas KI Applications of statins in cardiothoracic surgery: more than just lipid-lowering Review *European Journal of Cardiothoracic Surgery* 2008; 33: 377-390.

Parsaee H, Mc Ewan JR, Sunil J, MacDermot J. Differential sensitivities of the prostacyclin and nitric oxide biosynthetic pathways to cytosolic calcium in bovine aortic endothelium cells. *Br J Pharmacol.* 1992; 107: 1013-9.

Patel DN, Pagani FD, Koelling TM, Dyke DB, Baliga RR, Cody RJ, Lake KD, Aaronson KD. Safety and efficacy of atorvastatin in heart transplant recipients *J Heart Lung Transplant.* 2002 Feb; 21(2): 204-10.

Pearson Paul J and Vanhoutte Paul M Vasodilator and Vasoconstrictor Substances Produced by the Endothelium *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1993; 122: 2-31

Pedersen TR, Faergeman O, Kastelein JJP, Olsson AG, Tikkanen MJ, Holme I, Larsen ML, Bendiksen FS, Lindahl C, Szarek M, Tsai J. High-Dose Atorvastatin vs Usual-Dose Simvastatin for Secondary Prevention After Myocardial Infarction *JAMA* 2005; 294: 2437-2445.

Pereira AC, Sposito AC, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Mill JG, Krieger JE Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: New evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure *Atherosclerosis* 2006; 184: 193-200.

Pigazzi A, Heydrick S, Folli F, et al. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem* 1999; 274: 14368-14375.

Polla BS. Therapy by taking away: the case of iron. *Biochem Pharmacol.* 1999 Jun 15; 57(12): 1345-9. Review.

Ramasubbu K, Estep J, White DL, Deswal A, Mann DL. Experimental and Clinical Basis for the use of Statins in Patients With Ischemic and Nonischemic Cardiomyopathy *Journal of the American College of Cardiology.* 2008; 51(4): 415-426.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Nov 13; 148(3): 1482-9.

Randall MD, Alexander SPH, Bennett T. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 114-120.

Rosen P, Ballhausen T, Stockklauser K. Impairment of endothelium dependent relaxation in the diabetic rat heart: mechanisms and implications *Diabetes Res Clin Pract.* 1996 Jul; 31 Suppl: S143-55.

Rosenson RS. Pluripotential mechanisms of cardioprotection with HMG-CoA reductase inhibitor therapy. *Am J Cardiovasc Drugs* 2001; 1: 411-420.

Rosenson RS. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities *Atherosclerosis* 2004; 173: 1-12.

Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999 Nov; 138(5 Pt 2): S419-20. Review.

Romano M, Mezzetti A, Marulli C, et al. Fluvastatin reduces soluble P-selectin and IcaM-1 levels in hypercholesterolemic patients: role of nitric oxide. *J Invest Med* 2000; 48: 183-9

Rush JW, Denniss SG, Graham DA Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. *Can J Appl Physiol.* 2005 Aug; 30(4): 442-74. Review.

Sanders P, Faunt J. An unusual cause of cyanosis (isosorbide dinitrate induced methaemoglobinaemia) *Aust N Z J Med.* 1997 Oct; 27(5): 596.

Sasahara M, Raines EW, Chait A, Carew TE, Steinberg D, Wahl PW, Ross R. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. I. Is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation? *J Clin Invest.* 1994 Jul; 94(1): 155-64.

Scalia R, Stalker TJ. Microcirculation as a target for the anti-inflammatory properties of statins *Microcirculation*. 2002 Dec; 9(6): 431-42. Review.

Schiffrin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: Relation with structural changes. *Hypertension*. 1992; 19 (Suppl. II): II1-II9.

Schiffrin EL. The endothelium and the control of blood vessel function in health and disease. *Clin Invest Med*. 1994; 17: 602-20.

Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32: S2-S13.

Schulz R. Pleiotropic Effects of Statins *J Am Coll of Cardiol* 2005 ; 42: 1292-1294.

Senthil V, Suet NC, Tsybouleva N, Halder T, Nagueh SF, Willerson JT, Roberts R, Marian AJ. Prevention of Cardiac Hypertrophy by Atorvastatin in a Transgenic Rabbit Model of Human Hypertrophic Cardiomyopathy *Circ Res*. 2005; 97(3): 285-292.

Senzaki H, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, Paolocci N, Tomaselli GF, Hare JM, Kass DA. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *FASEB J*. 2001 Aug; 15(10): 1718-26.

Shepherd J. Statin therapy in clinical practice: new developments *Curr Opin Lipidol*. 1995 Oct; 6 (5):254-5. Review.

Shimokawa H, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res.* 1987; 61: 256-70.

Shimokawa H, Flavahan NA, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br J Pharmacol.* 1988; 95: 1197-1203.

Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31: 23-37.

Schini-Kerth VB, Vanhoutte PM. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Exp Physiol* 1995; 80: 885-905.

Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, et al. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA.* 2003; 289: 1675-1680.

Sia YT, Lapointe N, Parker TG, Tsoporis JN, Deschepper CF, Calderone A, Pourdjabbar A, Jasmin JF, Sarrazin JF, Liu P, Adam A, Butany J, Rouleau JL. Beneficial effects of long-term use of the antioxidant probucol in heart failure in the rat *Circulation.* 2002 May 28;105(21):2549-55.

Smith GD, Watson LP, Mathias CJ. Neurohumoral, peptidergic and biochemical responses to supine exercise in two groups with primary autonomic failure: Shy-Drager syndrome/multiple system atrophy and pure autonomic failure *Clin Auton Res.* 1996 Oct; 6(5): 255-62.

Sorof J, Berne C, Siewert-Delle A, Jorgensen L, Sager P; URANUS study investigators. Effect of rosuvastatin or atorvastatin on urinary albumin excretion

and renal function in type 2 diabetic patients *Diabetes Res Clin Pract.* 2006 Apr; 72(1): 81-7.

Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258: 1898-1902.

Standgaard S and S. Haunso Why does antihypertensive treatment prevent stroke but not myocardial infarction? *Lancet* 1987: 658–660.

Stauer B.E., Ventricular function and coronary hemodynamics in hypertensive heart disease. *Am J Cardiol* **44** (1979), pp. 999–1006.

Steinberg D An interpretative history of the cholesterol controversy: part 1. *J Lipid Res* 2004; 45: 1583-1593.

Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study *J Am Coll Cardiol.* 1997 Mar 1; 29(3): 630-4.

Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995 Feb; 95(2): 651-7.

Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, et al. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am j Pathol.* 2001;158; 879-891

Szwast SJ, Hendrie HC, Lane KA, Taylor SE, Unverzagt F, Murrell J, Deeg M, Ogunniyi A, Farlow MR, Hall KS. Association of statin use with cognitive decline in elderly Africans Americans. *Neurology.* 2007; 69 (19): 1873-80.

Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension *Circulation*. 1995 Apr 1; 91(7): 1981-7.

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Mattei P, Sudano I, Bernini G, Pinto S, Salvetti A. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women *Hypertension*. 1996 Oct; 28(4): 576-82.

Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, Liao JK. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy *J.Clin. Invest* 2001; 108: 1429-1437.

Taneva E, Borucki K, Wiens L, Makarova R, Schmidt-Lucke C, Luley C, Westphal S. Early Effects on Endothelial function of Atorvastatin 40 mg twice Daily and Its Withdrawal *Am J Cardiol* 2006; 97: 1002-1006.

Tardif JC, Côté G, Lespérance J, Bourassa M, Lambert J, Doucet S, Bilodeau L, Nattel S, de Guise P. Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. Multivitamins and Probucol Study Group *N Engl J Med*. 1997 Aug 7;337(6):365-72.

Terada LS, Guidot DM, Leff JA, Willingham IR, Hanley ME, Piermattei D, Repine JE. Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Apr 15; 89(8): 3362-6.

Tousoulis D, Antoniadis C, Vassiliadou C, Toutouza M, Pitsavos C, Tentolouris C, Trikas A, Stefanadis C. Effects of combined administration of low dose

atorvastatin and vitamin E on inflammatory markers and endothelial function in patients with heart failure *The European J of heart failure* 2005; 7: 1126-1132.

Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK. Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *J Biomed Biotechnol.* 2004; 2004(4): 227-237.

Triggle CR, Ding H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: is there a novel chemical mediator? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29: 153-160.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992; 20: S60-2.

Vallance Patrick and Chan Norman General Cardiology: endothelial function and nitric oxide: clinical relevance *Heart* 2001; 85: 342-350

Vallance P, Smart TG. The future of pharmacology. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan; 147 Suppl 1: S304-7.

Van Aelst L, Symons M. Role of Rho family GTPases in epithelial morphogenesis *Genes Dev.* 2002 May 1; 16(9): 1032-54. Review.

Vane JR. The Croonian Lecture, 1993: The endothelium: maestro of the blood circulation. *Phil Trans R Soc Lon B.* 1994; 348: 225-246.

Vanhoutte PM, Auch-Schwelk W, Boulanger C, Janssen PA, Katusic ZS, Komori K, Miller VM, Schini VB, Vidal M. Does endothelin-1 mediate endothelium-dependent contractions during anoxia? *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989; 13 Suppl 5: S124-8

Vanhoutte PM, Boulanger CM. Function of the endothelium in arterial hypertension *Rev Prat*. 1995 Dec 15; 45(20): 2513-8.

Vanhoutte PM. Endothelin-1. A matter of life and breath. *Nature*. 1994; 368: 693-4.

Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1996; 28: 2233-40.

Vanhoutte PM. Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst*. 2000; 81: 271-7.

Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacological Research*. 2004; 49: 503-508.

Vanhoutte PM, Perrault LP, Vilaine JP. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Endothelium in Clinical Practice*. 1997; Rubany GM, Dzau VM (eds). Marcel Dekker Inc Publ, USA, pp 265-90.

Vanhoutte PM.¹ Endothelial dysfunction and atherosclerosis *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1997 Nov; 90 Spec No 6:9-19. Review

Varma SD, Shen X, Lohman W. Copper catalyzed oxidation of ascorbate: chemical and ESR studies. *Lens Eye Toxic Res*. 1990;7(1): 49-66.

Vasan RS et D Levy. The role of hypertension in the pathogenesis of heart failure. *Arch Intern Med*. 1996; 156: 1789-96.

Vecchione C, Brandes RP. Withdrawal of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice *Circ Res* 2002; 91(2): 173-9.

Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, et al. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2002; 106: 1439-41

Virdis A, Ghiadoni L, Cardinal H, Favilla S, Durante P, Birindelli R, Magagna A, Bernini G, Salvetti G, Taddei S, Salvetti A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocystinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension *J Am Coll Cardiol*. 2001 Oct; 38(4): 1106-15.

Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Bohm M, Nickenig G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(2): 300-5.

Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J*. 2000; 14: 271–278.

Waters DD, What the Statin Trials Have Taught Us *Am J Cardiol* 2006; 98: 129-134.

Weber K T and C.G. Brilla, Pathological hypertrophy and the cardiac interstitium. Fibrosis and the renin–angiotensin–aldosterone system. *Circulation* 1991; 83: 1849–1865.

Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis *Circ* 2002; 105(6): 739-45.

Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C, Loscalzo J. Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 12503-8.

Welch GN, Upchurch GR Jr, Farivar RS, Pigazzi A, Vu K, Brecher P, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of NOS₂ *Proc Assoc Am Physicians*. 1998 Jan-Feb; 110(1): 22-31.

Werner M, Sacher J, Hohenegger M. Mutual amplification of apoptosis by statin-induced mitochondrial stress and doxorubicin toxicity in human rhabdomyosarcoma cells *Br J Pharmacol*. 2004 Nov; 143(6): 715-24

Witztum JL. Current approaches to drug therapy for the hypercholesterolemic patient *Circulation*. 1989 Nov; 80(5): 1101-14. Review.

Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-Dependent Effects of Statins *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 729-736.

Yasuda H, Nakatani S, Stugaard M, Tsujita-Kuroda Y, Bando K, Kobayashi J, Yamagishi M, Kitakaze M, Kitamura S, Miyatake K. Failure to prevent progressive dilation of ascending aorta by aortic valve replacement in patients with bicuspid aortic valve: comparison with tricuspid aortic valve. *Circulation*. 2003 Sep 9; 108 Suppl 1: II291-4.

Zhou Z, Rahme E, Pilote L. Are statins created equal? Evidence from randomized trials of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin for cardiovascular disease prevention *Am Heart J* 2006; 151: 273-81.

